

Wirksamkeit von Antibiotika gegenüber
replikativen und persistenten Formen von
Chlamydia psittaci

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin Katharina Wolf
geboren am 03.10.1982 in Eisenach

Gutachter

1. Prof. Dr. Eberhard Straube, Jena
2. Prof. Dr. Hans-Peter Saluz, Jena
3. Prof. Dr. Andreas Essig, Ulm

Datum der öffentlichen Verteidigung: 30.10.2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Zusammenfassung	XI
Summary	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Die Biologie der Chlamydien – biphasischer Entwicklungszyklus und Persistenz	1
1.2 Taxonomie und humanmedizinische Relevanz der Chlamydien	4
1.3 Die zoonotische Spezies <i>Chlamydia psittaci</i>	6
1.4 Chronische Chlamydieninfektionen - Grenzen von Diagnostik und Therapie..	9
1.5 Mit einer pulmonalen Chlamydieninfektion gehen komplexe Entzündungs- und Umbauprozesse einher	12
1.6 Zielstellung	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Zelllinien	17
2.1.2 Chlamydienstämme und weitere Mikroorganismen	17
2.2 Methoden	17
2.2.1 Kultivierung von Zellen	17
2.2.2 Anlegen von Kryokonserven der Zelllinien	18
2.2.3 Infektion von Zellen mit <i>Chlamydia psittaci</i>	18
2.2.4 Vermehrung von Chlamydien zum Anlegen von Kryokonserven	19
2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung infizierter Zellen	20
2.2.6 Isolierung genomischer DNA	21
2.2.7 Isolierung von Gesamt- RNA	21
2.2.8 Reverse Transkription der RNA	21
2.2.9 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)	22
2.2.10 Auswertung der differentiellen Genexpression	24
2.2.11 Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion von Amplifikaten	24

2.2.12	Klonieren chlamydialer, humaner und boviner Genfragmente	25
2.2.13	Isolierung von Plasmiden	26
2.2.14	Sequenzierung	26
2.2.15	Gewinnung und Bearbeitung der Proben des Tierversuchs.....	27
3	Ergebnisse	31
3.1	Etablierung eines durch Interferon- γ induzierten Persistenzmodells für <i>Chlamydia psittaci</i> in A549- Zellen	31
3.1.1	IFN γ verringert die Infektivität von <i>Chlamydia psittaci</i>	31
3.1.2	Charakterisierung von Anzahl und Morphologie der Inklusionen sowie der Produktivität von replikativen und persistenten <i>Chlamydia psittaci</i>	32
3.1.3	Persistente <i>Chlamydia psittaci</i> zeigen differentielle Genexpression.....	34
3.2	Sensitivität replikativer und persistenter <i>C. psittaci</i> gegenüber Antibiotika ...	42
3.2.1	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration gegenüber replikativen <i>C. psittaci</i>	42
3.2.2	Replikative <i>C. psittaci</i> werden durch Antibiotika bei frühzeitiger Zugabe zur Infektion effektiv inhibiert	43
3.2.3	Die Antibiotika zeigen eine eingeschränkte Wirksamkeit gegenüber persistenten <i>C. psittaci</i>	50
3.3	Analyse der Wirksamkeit von Antibiotika anhand der differentiellen Genexpression von <i>Chlamydia psittaci</i>	55
3.4	Untersuchung der Wirtszellgenexpression in Antibiotika- behandelten und - unbehandelten <i>C. psittaci</i> - infizierten A549- Zellen.....	66
3.4.1	Differentielle Regulierung von Wirtszellgenen in der replikativen und persistenten <i>C. psittaci</i> - Infektion.....	66
3.4.2	Veränderung der Wirtszellgenexpression nach Antibiotikabehandlung von <i>C. psittaci</i> - infizierten Zellen.....	69
3.5	Anwendung der <i>in vitro</i> - Untersuchungen auf das Tiermodell der bovinen respiratorischen <i>C. psittaci</i> - Infektion	73
3.5.1	Nachweis chlamydialer Transkripte in BALFs	73
3.5.2	<i>IL-8</i> - und <i>TNFRSF9</i> - Expression in BALFs.....	75
4	Diskussion.....	78
4.1	<i>Chlamydia psittaci</i> lässt sich mittels IFN γ <i>in vitro</i> in das Stadium der Persistenz versetzen und zeigt sowohl eine verringerte Replikation als auch Veränderungen der Expression verschiedener Gene	78

4.1.1	Etablierung des IFN γ -vermittelten Persistenzmodells.....	78
4.1.2	Chlamydiale Transkriptionsaktivität von replikativer im Vergleich zu persistenter <i>C. psittaci</i> - Infektion	82
4.2	Replikative <i>Chlamydia psittaci</i> werden durch Antibiotika effizienter inhibiert als persistente Chlamydien und spiegeln dies auch in ihrer Genexpression wider	85
4.2.1	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration verschiedener Antibiotika gegenüber replikativen <i>C. psittaci</i>	86
4.2.2	Die Antibiotika sind effizienter bei der Inhibition von replikativen als von persistenten <i>C. psittaci</i>	88
4.2.3	Die chlamydiale Genexpression reflektiert die unzureichende Wirksamkeit von Antibiotika gegenüber persistenten <i>C. psittaci</i>	91
4.3	<i>IL-8</i> und <i>TNFRSF9</i> sind <i>in vitro</i> differentiell reguliert und dienen als Indikator der Infektion <i>in vivo</i>	93
4.3.1	Die Antibiotikabehandlung <i>C. psittaci</i> - infizierter A549- Zellen verursacht eine Herunterregulierung von <i>IL-8</i> und <i>TNFRSF9</i>	93
4.3.2	<i>IL-8</i> und <i>TNFRSF9</i> sind im bovinen Modell der Antibiotikatherapie respiratorischer <i>C. psittaci</i> - Infektionen differentiell reguliert.....	96
5	Ausblick.....	99
6	Literaturverzeichnis	100
7	Danksagung.....	A
8	Ehrenwörtliche Erklärung.....	B
9	Veröffentlichungen	C
9.1	Publikationen	C
9.2	Mündliche Tagungsbeiträge	C
9.3	Posterbeiträge	D
10	Anhang.....	E
10.1	Material.....	E
10.1.1	Geräte und Laborausstattung	E
10.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	E
10.1.3	Chemikalien.....	F
10.1.4	Medien, Puffer und Lösungen	F
10.1.5	Antibiotika	G
10.1.6	Kits	G

10.1.7	Antikörper, Enzyme und Zytokine	H
10.1.8	DNA- Marker, Nukleotide und Primer.....	H
10.1.9	Software.....	H
10.2	Primer	I
10.3	Zellkulturassays zur Antibiotikabehandlung replikativer und persistenter <i>C. psittaci</i> - Infektionen	K
10.4	Chlamydiale Genexpression unter Antibiotikabehandlung.....	M
10.5	Genexpression von <i>IL-8</i> und <i>TNFRSF9</i> in Lungengewebe von Kälbern.....	O

Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotikum/ Antibiotika
AMV	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BALF	Bronchoalveoläre Lavage Fluid
BGM	Afrikanische Grüne Meerkatze („ <i>Buffalo Green Monkey</i> “)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung (<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>)
CT	<i>cycle threshold</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dpi	Tage nach Inokulation (<i>days post inoculation</i>)
dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>double- stranded DNA</i>)
EB	Elementarkörperchen (<i>elementary body</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLI	Friedrich- Loeffler- Institut
h p.i.	Stunden nach Infektion (<i>hours post infection</i>)
HSP60	<i>Heat shock protein 60</i>
HSP70	<i>Heat shock protein 70</i>
IDO	Indolamin- 2,3- Dioxygenase
IFN γ	Interferon- γ
IFU	Inklusionen- bildende Einheiten (<i>inclusion forming units</i> = EBs)
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
LB	<i>lysogeny broth</i>

LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Laser Scanning Mikroskop(ie)
MALT	Schleimhaut- assoziiertes lymphoides Gewebe (<i>mucosa associated lymphoid tissue</i>)
MBC	Minimale Bakterizide Konzentration (<i>minimal bactericidal concentration</i>)
MIC	Minimale Hemmkonzentration (<i>minimal inhibitory concentration</i>)
MOI	Infektionsdosis (<i>multiplicity of infection</i>)
MOMP	<i>major outer membrane porin/ protein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mediumwechsel
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PB	Persistenzkörperchen (<i>persistent body</i>)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMPs	<i>polymorphic membrane proteins</i>
QRDR	Chinolon- Resistenz- bestimmende Regionen (<i>quinolone- resistance determining regions</i>)
RB	Retikularkörperchen (<i>reticulate body</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>standard error of mean</i>
S.O.C.	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
TAE	Tris- Acetat- EDTA (Puffer)
<i>tet</i> (C)	Allel für Tetrazyklin- Resistenz
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
tRNA	Transfer- RNA
Trp	Tryptophan
TTSS	Typ- III- Sekretionssystem (<i>type three secretion system</i>)
U	Einheiten (<i>units</i>)

Abbildungsverzeichnis

Nr.	Titel	Seite
1	Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus einer replikativen Chlamydieninfektion sowie des Persistenzstadiums	2
2	Taxonomie und Hauptwirte der Chlamydiaceae	5
3	Etablierung des IFN γ -vermittelten Persistenzmodells für <i>C. psittaci</i> in A549-Zellen	31
4	Anzahl und Morphologie der Inklusionen und Produktivität replikativer und persistenter <i>C. psittaci</i>	33
5	relative Anzahl chlamydialer Genome in replikativer und persistenter <i>C. psittaci</i> -Infektion	36
6	relative Expression von <i>16S rRNA</i> und <i>rpoA</i> in der replikativen und persistenten <i>C. psittaci</i> -Infektion	38
7	relative Expression von <i>gyrA</i> , <i>ompA</i> , <i>ftsW</i> und <i>amiB</i> in der replikativen und persistenten <i>C. psittaci</i> -Infektion	39
8	relative Expression von <i>pgk</i> , <i>amn</i> und <i>glgP</i> in der replikativen und persistenten <i>C. psittaci</i> -Infektion	40
9	relative Expression von <i>cpaf</i> , <i>Tsp</i> , <i>cHtrA</i> und <i>sctN</i> in der replikativen und persistenten <i>C. psittaci</i> -Infektion	41
10	relative Expression von <i>groEL</i> in der replikativen und persistenten <i>C. psittaci</i> -Infektion	42
11	Zellkulturassays zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeiten replikativer <i>Chlamydia psittaci</i>	44
12	Rekultivierbarkeit replikativer <i>C. psittaci</i> zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion und (mehrmaligem) Mediumwechsel	45
13	Reduktion der Anzahl rekultivierbarer Chlamydien nach Antibiotikabehandlung einer replikativen Infektion bei Zugabe der Antibiotika 12 h p.i.	46
14	Reduktion der Anzahl rekultivierbarer Chlamydien nach Antibiotikabehandlung einer replikativen Infektion bei Zugabe der Antibiotika 48 h p.i.	48
15	Rekultivierbarkeit persistenter <i>C. psittaci</i> zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion und (mehrmaligem) Mediumwechsel	51
16	Reduktion der Anzahl rekultivierbarer Chlamydien nach Antibiotikabehandlung einer persistenten Infektion bei Zugabe der Antibiotika 12 h p.i.	52
17	Reduktion der Anzahl rekultivierbarer Chlamydien nach Antibiotikabehandlung einer persistenten Infektion bei Zugabe der Antibiotika 48 h p.i.	54

Nr.	Titel	Seite
18	relative Anzahl chlamydialer Genome nach Antibiotikabehandlung replikativer und persistenter <i>C. psittaci</i> im Verhältnis zur AB- unbehandelten Kontrolle	56
19	relative Expression der prozessierten Form der <i>16S rRNA</i> nach Antibiotikabehandlung replikativer bzw. persistenter <i>C. psittaci</i> im Verhältnis zur AB- unbehandelten Kontrolle	60
20	relative Expression von <i>ompA</i> nach Antibiotikabehandlung replikativer bzw. persistenter <i>C. psittaci</i> im Verhältnis zur AB- unbehandelten Kontrolle	61
21	relative Expression von <i>ftsW</i> nach Antibiotikabehandlung replikativer bzw. persistenter <i>C. psittaci</i> im Verhältnis zur AB- unbehandelten Kontrolle	63
22	relative Expression von <i>Tsp</i> nach Antibiotikabehandlung replikativer bzw. persistenter <i>C. psittaci</i> im Verhältnis zur AB- unbehandelten Kontrolle	64
23	relative Expression von <i>groEL</i> nach Antibiotikabehandlung replikativer bzw. persistenter <i>C. psittaci</i> im Verhältnis zur AB- unbehandelten Kontrolle	65
24	relative Expression von <i>IL-8</i> in replikativer und persistenter Infektion von A549- Zellen und in entsprechenden nicht- infizierten Kontrollen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion im Verhältnis zu <i>GAPDH</i>	68
25	relative Expression von <i>TNFRSF9</i> in replikativer und persistenter Infektion von A549- Zellen und in entsprechenden nicht- infizierten Kontrollen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion im Verhältnis zu <i>GAPDH</i>	69
26	Expressionsänderung von <i>IL-8</i> nach Antibiotikabehandlung replikativer bzw. persistenter <i>C. psittaci</i> - Infektionen gegenüber der Antibiotika- unbehandelten Kontrolle	71
27	Expressionsänderung von <i>TNFRSF9</i> nach Antibiotikabehandlung replikativer bzw. persistenter <i>C. psittaci</i> - Infektionen gegenüber der Antibiotika- unbehandelten Kontrolle	72
28	Anteil Chlamydien- mRNA- positiver BALFs nach verschiedenen Behandlungsstrategien	74
29	relative Expression von <i>IL-8</i> in BALF- Zellen von <i>C. psittaci</i> - infizierten Kälbern nach Behandlung mit verschiedenen Antibiotika	76
30	relative Expression von <i>TNFRSF9</i> in BALF- Zellen von <i>C. psittaci</i> - infizierten Kälbern nach Behandlung mit verschiedenen Antibiotika	77
31	Expression von <i>IL-8</i> bzw. <i>TNFRSF9</i> in makroskopisch verändertem bzw. unverändertem Lungengewebe <i>C. psittaci</i> - infizierter Kälber sowie in Gewebe nicht- infizierter Tiere	O

Tabellenverzeichnis

Nr.	Titel	Seite
1	benötigte Anzahl IFUs für die Infektion von Zellen	19
2	Zusammensetzung eines Reaktionsmixes für die Endpunkt- PCR	22
3	PCR- Profil für Endpunkt- PCR	22
4	Zusammensetzung eines PCR- Ansatzes für die real- time PCR	23
5	PCR- Profil für real- time PCR	23
6	Zusammensetzung des Sequenz- PCR- Ansatzes	26
7	PCR- Profil für Sequenz- PCR	27
8	Behandlungsstrategien des Kälbersversuchs	28
9	zur Analyse ausgewählte chlamydiale Gene	35
10	differentielle Transkription verschiedener chlamydialer Gene in der persistenten gegenüber der replikativen <i>C. psittaci</i> - Infektion in A549- Zellen	36
11	Minimale Hemmkonzentrationen von Antibiotika	43
12	Expressionsänderung ausgewählter chlamydialer Gene unter Antibiotikabehandlung replikativer und persistenter <i>C. psittaci</i> - Infektionen	58
13	zur Analyse ausgewählte Wirtszellgene	66
14	Expressionsänderung von Wirtszellgenen im Zeitverlauf in der replikativen bzw. persistenten <i>C. psittaci</i> - Infektion im Vergleich zur jeweiligen nicht-infizierten Kontrolle	67
15	Expressionsänderung von <i>IL-8</i> und <i>TNFRSF9</i> unter Antibiotikabehandlung replikativer und persistenter Infektionen im Vergleich zur jeweiligen AB-unbehandelten Kontrolle	70
16	Primerpaare für chlamydiale Gene	I
17	Primerpaare für humane Gene	J
18	Primerpaare für bovine Gene	J
19	Reduktion rekultivierbarer Chlamydien nach Antibiotikabehandlung replikativer <i>C. psittaci</i> - Infektion zum Zeitpunkt 12 h p.i.	K
20	Reduktion rekultivierbarer Chlamydien nach Antibiotikabehandlung replikativer <i>C. psittaci</i> - Infektion zum Zeitpunkt 48 h p.i.	K
21	Reduktion rekultivierbarer Chlamydien nach Antibiotikabehandlung persistenter <i>C. psittaci</i> - Infektion zum Zeitpunkt 12 h p.i.	L

Nr.	Titel	Seite
22	Reduktion rekultivierbarer Chlamydien nach Antibiotikabehandlung persistenter <i>C. psittaci</i> - Infektion zum Zeitpunkt 48 h p.i.	L
23	Expressionsänderung ausgewählter chlamydialer Gene unter Antibiotikabehandlung replikativer <i>C. psittaci</i> - Infektionen im Vergleich zur AB-unbehandelten Kontrolle	M
24	Expressionsänderung ausgewählter chlamydialer Gene unter Antibiotikabehandlung persistenter <i>C. psittaci</i> - Infektionen im Vergleich zur AB-unbehandelten Kontrolle	N

Zusammenfassung

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Pathogene, die einen biphasischen Lebenszyklus besitzen. Zur Therapie akuter Chlamydieninfektionen werden Tetracykline, Makrolide und Fluorchinolone eingesetzt. Unter Antibiotikaeinfluss können Chlamydien von ihrem normalen Entwicklungszyklus abweichen und in die Persistenz übergehen, welche durch lebensfähige, nicht-replikative und aberrante chlamydiale Formen charakterisiert ist. Diese chlamydiale Persistenz wird mit chronischen Infektionen assoziiert, welche schlecht auf Antibiotika ansprechen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein IFN γ -vermitteltes Persistenzmodell für die zoonotische Spezies *Chlamydia psittaci* DC15 in Lungenepithelzellen etabliert, welches zur Untersuchung der Wirksamkeit von Antibiotika diente. Persistente *C. psittaci* zeichneten sich durch eine signifikante Verringerung der neugebildeten infektiösen Chlamydien gegenüber replikativen *C. psittaci* aus. Auch eine Reduktion der Anzahl und morphologische Veränderungen der intrazellulären Einschlusskörper, der sogenannten Inklusionen, waren ein Merkmal dieses Persistenzmodells. Analysen der Expression chlamydialer Gene zeigten in der persistenten gegenüber der replikativen Infektion eine differentielle Transkription von Genen, welche mit der chlamydialen Transkription/ Translation bzw. der Pathogen- Wirt-Interaktion assoziiert sind.

Für die Untersuchung der Wirksamkeit von Antibiotika gegenüber replikativen und persistenten *C. psittaci* wurden Doxycyclin, Erythromycin, Levofloxacin und deren Kombinationen mit Rifampicin eingesetzt. Zur Bestimmung geeigneter Antibiotikakonzentrationen, welche für die Analysen anzuwenden waren, wurde die Minimale Hemmkonzentration der genannten Antibiotika ermittelt. Die Rekultivierung von neugebildeten infektiösen Chlamydien nach Antibiotikabehandlung demonstrierte, dass replikative *C. psittaci* effektiv inhibiert wurden, während die Antibiotika gegenüber persistenten *C. psittaci* eine unzureichende Effizienz aufwiesen. Levofloxacin zeigte dabei die höchste Wirksamkeit, während Erythromycin und teilweise Doxycyclin die Bildung infektiöser rekultivierbarer Chlamydien weniger effektiv inhibierten. Ihre Wirksamkeit ließ sich durch Kombination mit Rifampicin steigern. Durch Analysen der chlamydialen Genexpression unter Antibiotikaeinfluss wurden diese Ergebnisse bestätigt, wobei eine starke Änderung der Transkriptionsaktivität in replikativen *C. psittaci* festgestellt werden konnte, während persistente Chlamydien eine geringere differentielle Transkription gegenüber der unbehandelten Kontrolle aufwiesen. Insgesamt zeigte vor allem *ompA*, ein Gen für ein chlamy-

diales Membranprotein, eine starke Änderung seiner Transkription unter Antibiotikabehandlung.

In *C. psittaci*-infizierten Zellen wurden zwei Gene, die mit Entzündungsprozessen des Wirtsorganismus assoziiert sind, *IL-8* und *TNFRSF9*, gegenüber der nicht-infizierten Kontrolle hochreguliert. Beide Gene wurden durch die Antibiotikabehandlung replikativer und persistenter *C. psittaci*-Infektionen herunterreguliert und wiesen damit indirekt auf ein Ansprechen der Chlamydien auf die Antibiotika hin. Doch auch hier wurde die unzureichende Wirksamkeit der ausgewählten Antibiotika gegen persistente *C. psittaci* deutlich.

Die Erkenntnisse und Methoden der *in vitro*-Analysen wurden auf ein bovines Modell der antibiotischen Therapie der respiratorischen *C. psittaci*-Infektion übertragen. Dabei wurde chlamydiale mRNA in bronchoalveolären Lavage Fluids (BALFs) infizierter Kälber nachgewiesen. Die Anzahl der Tiere, deren BALFs chlamydiale Transkriptionsaktivität aufwiesen, nahm im Verlauf der Zeit ab. Die differentielle Transkription von *IL-8* und *TNFRSF9* in Zellen der BALFs war unabhängig von einer Antibiotikabehandlung, korrelierte jedoch gut mit den Entzündungs- und Tissue-Remodeling-Prozessen, welche in diesem Modell beobachtet wurden. Somit kann vermutet werden, dass die *C. psittaci*-Infektion vor allem durch die Immunantwort der Tiere eingedämmt wurde und möglicherweise durch diese in ein subakut-persistentes Stadium überführt wurde, welches keine offensichtliche Immunantwort stimuliert.

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe von Expressionsanalysen chlamydialer und Wirtszellgene und Rekultivierungsversuchen gezeigt werden, dass persistente *C. psittaci* weniger auf eine antibiotische Behandlung ansprechen als replikative *C. psittaci*. Dabei erwiesen sich Fluorchinolone und Kombinationsbehandlungen mit Rifampicin als wirksamste Behandlungsstrategien.

Summary

Chlamydiae are obligate intracellular pathogens that possess a biphasic life cycle. Acute chlamydial infections are usually treated with tetracyclines, macrolides, and fluoroquinolones. Influenced by antimicrobials chlamydiae may deviate from their normal developmental cycle and enter to a persistent state that is characterised by viable, but non-cultivable aberrant chlamydial bodies. This chlamydial persistence is associated with chronic infections in that antimicrobial therapy may fail.

In the present study, an IFN γ -mediated persistence model for the zoonotic species *Chlamydia psittaci* DC15 was established in alveolar epithelial cells to evaluate the efficacy of antimicrobials. Persistent *C. psittaci* displayed a significant decrease of the production of infectious progeny compared to replicative *C. psittaci*. Additionally, a reduced number of chlamydial inclusions accompanied by morphological changes were also features of this persistence model. Gene expression analyses revealed the differential expression of several chlamydial genes in persistent compared to replicative bacteria. Especially genes associated with chlamydial transcription/translation and pathogen-host-interaction were differentially expressed.

The efficacies of doxycycline, erythromycin, levofloxacin, and their combinations with rifampicin against replicative and persistent *C. psittaci* were evaluated. To apply suitable antimicrobial concentrations the minimal inhibitory concentrations of the above mentioned antimicrobials were determined. Recultivation of infectious chlamydial progeny upon antimicrobial treatment demonstrated the effective inhibition of replicative *C. psittaci* whereas the tested antimicrobials exhibited a decreased efficacy against persistent *C. psittaci*. Levofloxacin was the most efficient antimicrobial whereas the generation of infectious chlamydiae was less suppressed by erythromycin and in part doxycycline. However their efficacy could be increased by combining them with rifampicin. These results were confirmed by analysis of the chlamydial gene expression during antimicrobial treatment. A strong differential expression of chlamydial genes could be observed in antimicrobially treated replicative bacteria whereas persistent chlamydiae exhibited a less pronounced differential expression compared to the untreated control. Most strikingly, the transcription of *ompA*, encoding a chlamydial membrane protein, changed strongly during antimicrobial treatment.

In alveolar epithelial cells infected with *C. psittaci* two genes related to inflammatory processes of the host, namely *IL-8* and *TNFRSF9*, were up-regulated compared to non-

infected cells. Upon antimicrobial treatment of replicative and persistent infection, both genes were down-regulated indicating the antichlamydial effect. Again, the insufficient efficacy of the used antimicrobials against persistent *C. psittaci* became apparent.

The findings and methods of the *in vitro* analyses were applied to a bovine model of antimicrobial treatment of respiratory *C. psittaci* infection. Chlamydial mRNA was detected in bronchoalveolar lavage fluids (BALFs) of infected calves. The number of calves whose BALFs exhibited chlamydial transcription activity decreased over time. *IL-8* and *TNFRSF9* were transcribed by BALF cells independently of an antimicrobial treatment. However, their transcription correlated well with inflammatory and tissue remodeling processes that were observed in this model. One can assume, that the host immune response is sufficient to combat the infection by *C. psittaci* and thereby elicits a subacute- persistent state of the bacteria that does not stimulate an apparent immune response.

In this study, recultivation experiments and analyses of chlamydial and host gene expression were used to demonstrate, that the antimicrobial treatment of persistent *C. psittaci* is less efficient than the treatment of replicative *C. psittaci*. Fluorquinolones and combinations with rifampicin were shown to be the most efficient treatment strategies.

1 Einleitung

1.1 Die Biologie der Chlamydien – biphasischer Entwicklungszyklus und Persistenz

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Bakterien, welche aufgrund der Struktur ihrer Zellwand den gram- negativen Bakterien zugeordnet werden. Sie besitzen einen biphasischen Lebenszyklus mit zwei, an ihre jeweilige Umgebung und Aufgabe optimal angepassten, morphologischen Formen: das extrazelluläre Elementarkörperchen (**elementary body**, EB) und das intrazelluläre Retikularkörperchen (**reticulate body**, RB) (MOULDER 1991).

Die EBs stellen die infektiöse Form der Chlamydien dar. Sie sind ca. 0,3 µm groß, metabolisch inaktiv und ihr Nucleoid ist stark kondensiert, wodurch sie eine elektronendichte Morphologie erhalten (MATSUMOTO 1973). Ihre Zellwand besitzt kaum oder kein Peptidoglycan und ihre Integrität wird durch Disulfidbrücken zwischen Cystein- reichen Membranproteinen aufrechterhalten (HACKSTADT *et al.* 1985, ABDELRAHMAN and BELLAND 2005). Somit besitzen EBs eine sehr hohe Tenazität gegenüber Umwelteinflüssen und sind gut an extrazelluläre Umgebungen und die Übertragung von Wirt zu Wirt angepasst (BEATTY *et al.* 1994d). Die Anheftung der EBs an die Wirtszelle erfolgt durch die Bindung chlamydialer Membranproteine (u.a. MOMP, HSP70, PMPs) an Glykosaminoglykane der Wirtszelle (z.B. Heparansulfat) (RAULSTON *et al.* 1993, STEPHENS *et al.* 2001, FADEL and ELEY 2007, MOELLEKEN and HEGEMANN 2008, FECHTNER *et al.* 2013). Anschließend sezerniert das EB durch sein Typ- III- Sekretionssystem (**type three secretion system**, TTSS) ein Effektorprotein in die Wirtszelle, welches die Reorganisation des Aktin- Cytoskeletts bewirkt und somit die Aufnahme des EB in die Zelle initiiert (CLIFTON *et al.* 2004). Diese geschieht durch Umschließen des EB durch die Wirtszellmembran und Abschnüren der entstandenen Vakuole (chlamydiale Inklusion) in das Zytoplasma (ABDELRAHMAN and BELLAND 2005). Die unmittelbar nach der Internalisierung einsetzende Transkription und damit Proteinsynthese markiert den Beginn der Differenzierung zu metabolisch aktiven RBs (PLAUNT and HATCH 1988). Diese Form der Chlamydien ist ca. 1 µm groß und weist weniger stark kondensierte DNA auf, wodurch sie eine weniger dichte, granuläre Morphologie besitzt (ABDELRAHMAN and BELLAND 2005). RBs sind von einer inneren und äußeren, hochlabilen Membran umschlossen, weshalb sie außerhalb der Wirtszelle nicht überdauern können (TAMURA *et al.* 1967, ABDELRAHMAN and BELLAND 2005). Durch diese Membran sowie die Inklusionsmembran beziehen RBs Nährstoffe und ATP aus der Wirtszelle. Der Umfang dieses

„Energieparasitismus“ ist dabei speziesspezifisch und richtet sich nach der jeweiligen genetischen Ausstattung der betreffenden Art (OMSLAND *et al.* 2014).

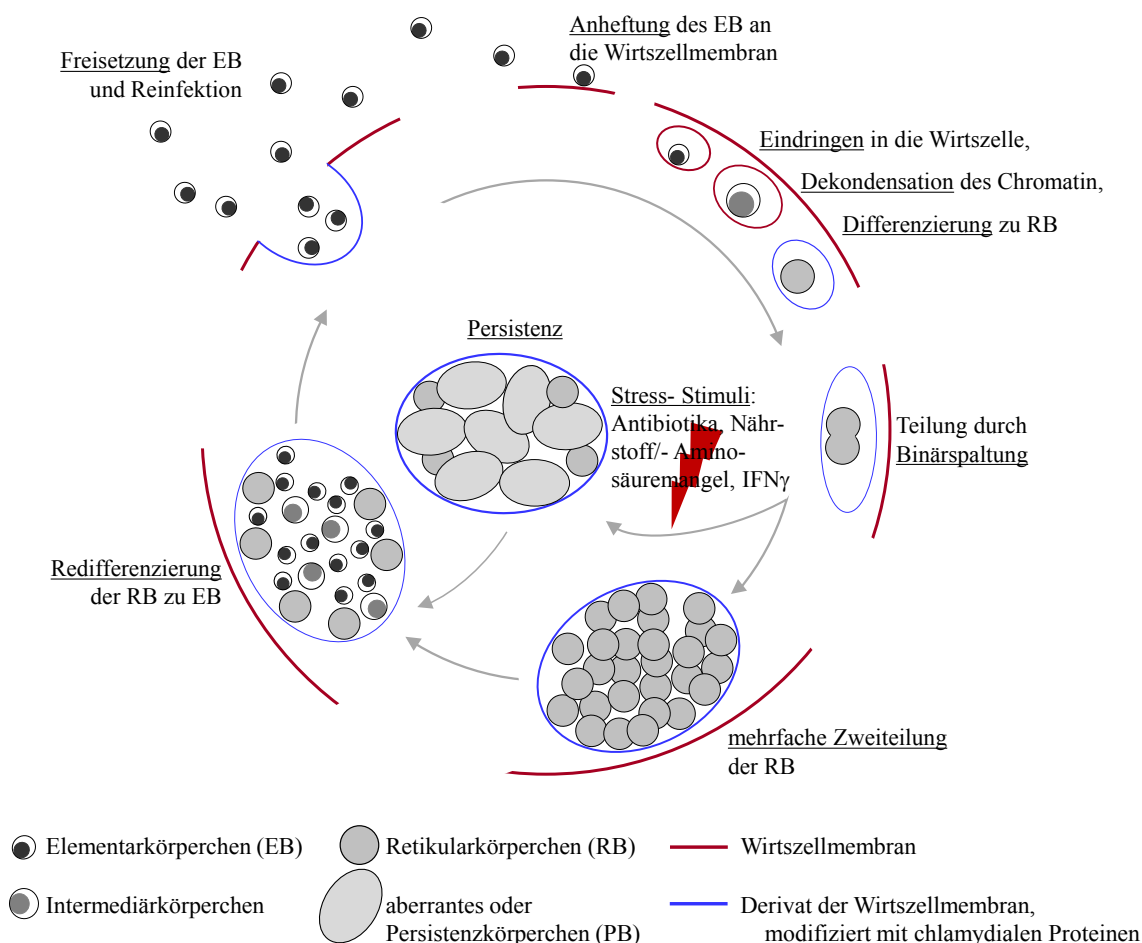


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus einer replikativen Chlamydieninfektion sowie des Persistenzstadiums; Abbildung modifiziert nach (ABDELRAHMAN and BELLAND 2005)

Im Laufe des Entwicklungszyklus (Abbildung 1) wird die Inklusionsmembran mit chlamydialen Proteinen modifiziert, wodurch die Inklusion der phagolysosomalen Reifung durch die Wirtszelle entgeht (FRIIS 1972, WYRICK and BROWNRIDGE 1978). Auch während dieses Stadiums werden Effektorproteine mit Hilfe eines TTSS in das Wirtszellzytosol sezerniert, die u.a. der Modifikation der Wirtszell-Apoptose und -Nekrose sowie der Interaktion mit dem Zytoskelett dienen und damit die ungestörte intrazelluläre Replikation der Chlamydien sicherstellen (MÜLLER *et al.* 2008, YU *et al.* 2010).

Die Replikation der Chlamydien findet durch Binärsplaltung der RBs statt, wobei die Dauer der replikativen Phase von der jeweiligen Spezies abhängt (WYRICK 2000). Auch die Gesamtdauer eines Entwicklungszyklus ist sowohl abhängig von der Chlamydienspezies,

aber auch der Art der Wirtszelle sowie den umgebenden Bedingungen (BEATTY *et al.* 1994d). So wurde für *Chlamydia psittaci* gezeigt, dass ein Entwicklungszyklus *in vitro* ca. 24 bis 30 Stunden dauert, während *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* 48 bzw. 72 Stunden benötigen (MOULDER 1991, PERFETTINI *et al.* 2003). Ausgelöst durch ATP- und Nährstoffmangel in der Wirtszelle, beginnen die RBs nach acht bis zwölf Teilungen zu Intermediärkörperchen und anschließend EBs zu rekonvertieren, welche durch einen bisher nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus freigesetzt werden und benachbarte Zellen infizieren können (MOULDER 1991, PERFETTINI *et al.* 2003, WYRICK 2010).

Als intrazelluläre Pathogene sind Chlamydien sehr stark auf die Bedingungen in ihrer Wirtszelle angewiesen um eine normale Entwicklung vollziehen zu können. Kommt es zu Abweichungen von den optimalen Bedingungen, so können die Chlamydien in eine modifizierte, statische Form des oben beschriebenen Lebenszyklus eintreten. Diese sogenannte Persistenz zeichnet sich durch lebensfähige aber nicht-replikative, vergrößerte und morphologisch aberrante RBs aus. Die RBs stellen die Replikation ein und rekonvertieren nicht zu EBs, sondern erhalten als so genannte Persistenzkörperchen (**persistent bodies**, PBs) eine stabilere Verbindung mit der Wirtszelle aufrecht (BEATTY *et al.* 1994d). Während dieser Zeit wird der chlamydiale Metabolismus eingeschränkt. Die DNA-Replikation schreitet weiter voran, jedoch wird die Zellteilung nicht vollzogen (NICHOLSON 2002, SCHOBORG 2011). Diese PBs wurden zuerst von Matsumoto und Manire beobachtet, welche zeigten, dass die Behandlung infizierter Zellen mit Penicillin zu abnormalen chlamydialen Körperchen führte (MATSUMOTO and MANIRE 1970). Moulder und Kollegen schlugen 1980 als erste die Anwesenheit persistenter intrazellulärer Chlamydien vor, nachdem sie in einem Langzeitinfektionsmodell von murinen Fibroblasten mit *C. psittaci* trotz Abwesenheit typischer chlamydialer Inklusionen immer wieder Merkmale einer Infektion wahrnahmen (MOULDER *et al.* 1980).

Neben Langzeitkultivierung infizierter Zellen und β -Laktam-Antibiotika zählen u.a. Aminosäure-, Glucose- bzw. Eisenmangel, Ko-Infektionen mit Viren oder die Infektion von Monozyten zu den *in vitro* Persistenz-auslösenden Stimuli (SCHOBORG 2011). Auch die Chlamydieninfektion von Fibroblasten stellt ein Persistenzmodell dar, dem *in vivo* eine große Bedeutung zukommt (RODEL *et al.* 1998, BAUMERT *et al.* 2009, GROSSE 2012). Ein wichtiges, anerkanntes und sehr gut charakterisiertes Modell ist die IFN γ -vermittelte Persistenz von Chlamydien in epithelialen Zellen (BEATTY *et al.* 1994d, HOGAN *et al.* 2004, SCHOBORG 2011). Der Zusammenhang zwischen der IFN γ -Behandlung Chlamy-

dien- infizierter Zellen und dem veränderten Entwicklungszyklus von *C. psittaci* wurde zuerst durch die Gruppe um Byrne beschrieben, die später auch zeigte, dass die Persistenz-induktion auf dem indirekten Entzug der Aminosäure Tryptophan beruht (BYRNE and KRUEGER 1983, BYRNE *et al.* 1986). Taylor und Feng beschrieben die Wirkweise des IFN γ . Es aktiviert die zelluläre Indolamin-2,3-Dioxygenase, welche daraufhin Tryptophan zu Kynurenin degradiert und somit die intrazellulären Tryptophan- Pools stark verringert. Sowohl Wirtszelle als auch intrazelluläres Pathogen stellen unter den Mangelbedingungen ihre Proliferation ein (TAYLOR and FENG 1991). Spätere Arbeiten zeigten, dass die IFN γ - vermittelte Persistenz auch für *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* in verschiedenen Zelltypen induziert werden kann (BEATTY *et al.* 1994b, 1994a, PANTOJA *et al.* 2000). Die IFN γ - vermittelte Persistenz kann durch die Zugabe exogenem Tryptophans aufgehoben werden (BYRNE *et al.* 1986). Allen Persistenzmodellen gemein ist, dass sie reversibel sind, d.h. nach Entzug des Stimulus treten die Chlamydien wieder in ihren produktiven Entwicklungszyklus ein (SCHOBORG 2011).

1.2 Taxonomie und humanmedizinische Relevanz der Chlamydien

Das Phylum der *Chlamydiae* wird aufgrund der Sequenzanalyse der *16S rDNA* klar von allen weiteren Bakterienphyla abgegrenzt. Es besteht aus der Klasse der *Chlamydia* und diese wiederum aus der Ordnung der *Chlamydiales*. Sie beinhaltet zurzeit neben den gesicherten humanpathogenen *Chlamydiaceae* und *Simkaniaceae* sieben weitere Familien: *Clavichlamydiaceae*, *Criblamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Piscichlamydiaceae*, *Rhabdochlamydiaceae* und *Waddliaceae* (HORN 2011).

Innerhalb der *Chlamydiaceae* werden derzeit neun Arten, basierend auf der Sequenzanalyse von *16S* und *23S rDNA*, in der Gattung *Chlamydia* zusammengefasst (EVERETT *et al.* 1999, SCHACHTER *et al.* 2001, HORN 2011). Abbildung 2 zeigt die Phylogenie dieser Arten, ihre, auf der Sequenzanalyse der *16S rDNA* beruhenden, verwandtschaftlichen Beziehungen untereinander, sowie ihre Hauptwirte (HORN 2011).

Neuere Studien deuten auf die Existenz von zwei bis drei weiteren aviären Chlamydien-spezies hin (VORIMORE *et al.* 2013, SACHSE *et al.* 2014, SACHSE *et al.* 2015).

Die in der Humanmedizin bedeutendsten Chlamydien-spezies sind *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*. Aber auch die zoonotischen Arten *C. abortus* und *C. psittaci* können Humanpathogene darstellen.

Die Spezies ***C. trachomatis*** umfasst mehrere Serovare, welche aufgrund ihrer Gewebsspezifität, Pathogenese und biologischen Charakteristika drei Biovarien zugeordnet werden.

Die okularen Serovare werden durch Schmierinfektionen oder auch Fliegen übertragen und verursachen Konjunktivitis und das Trachom (TAYLOR 2002, MABEY *et al.* 2003, WRIGHT *et al.* 2008). Die sexuell übertragbaren genitalen Serovare rufen Infektionen des Urogenitaltrakts hervor (BEBEAR and DE BARBEYRAC 2009). Die Vertreter des dritten Biovars werden ebenfalls sexuell übertragen und verursachen das Lymphogranuloma venereum, eine systemische Infektion, welche von Lymphadenopathie oder Lymphadenitis begleitet wird (HORN 2011).

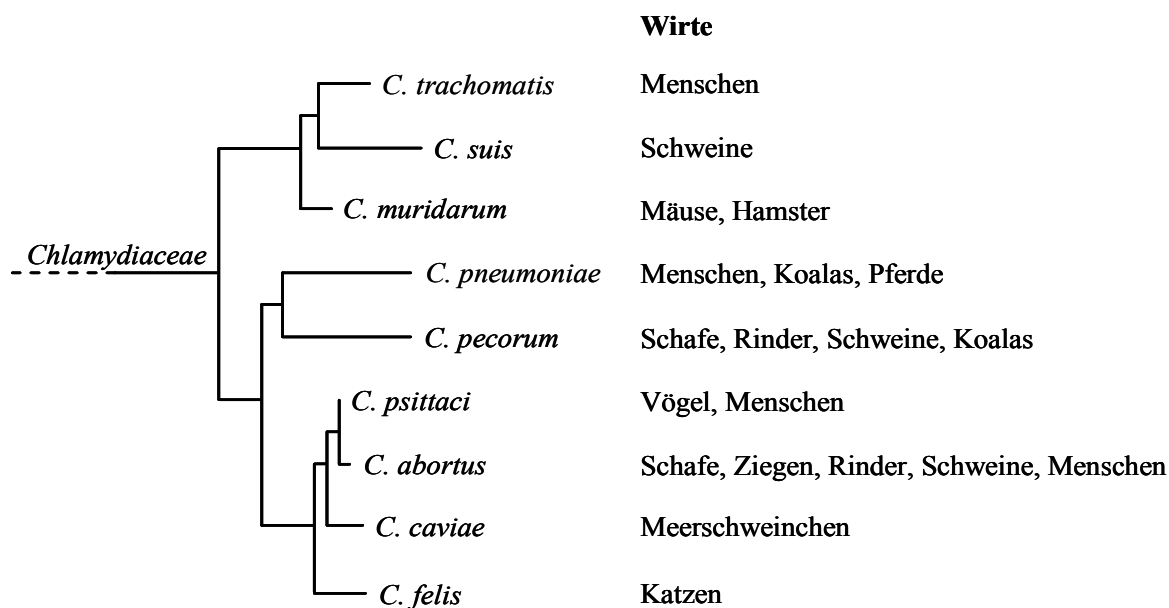


Abbildung 2: Taxonomie und Hauptwirte der *Chlamydiaceae*; modifiziert nach den Gruppen um Everett und Horn (EVERETT *et al.* 1999, HORN 2011)

Von der Spezies *C. pneumoniae* existieren 3 Biovare aus Menschen, Koalas bzw. Pferden (HORN 2011). Dieser Erreger befällt primär den Respirationstrakt. Die Infektion geht mit einer Laryngitis, seltener mit einer atypischen Pneumonie einher, die oft unerkannt oder mild verläuft. *C. pneumoniae* ist, abhängig von Region, Alter der Patienten und Diagnosemethoden für bis zu 6 % aller ambulant erworbenen Pneumonien verantwortlich (HAMMERSCHLAG 2000, DUMKE *et al.* 2015). Die Antikörper-Prävalenz ist bei älteren Erwachsenen mit mehr als 80 % sehr hoch (HAMMERSCHLAG 2000).

Die zoonotische Spezies *C. abortus* hat ihr natürliches Reservoir vorwiegend in landwirtschaftlichen Nutztieren, wo es vor allem bei der Infektion trächtiger Tiere zu Aborten und wirtschaftlichen Einbußen kommen kann. Durch unsachgemäßen Umgang mit infizierten Tieren und deren Ausscheidungen kann es zu einer Übertragung auf den Menschen kom-

men. Eine Infektion Schwangerer kann zu Abort oder Frühgeburt führen, sowie eine schwere systemische Infektion der Frau auslösen (LONGBOTTOM and COULTER 2003). *C. psittaci* ist die einzige gesicherte Chlamydienspezies, welche ihr natürliches Reservoir in Vögeln (vorwiegend Psittazine, domestizierte und Wildvögel) hat, jedoch ebenfalls als Zoonose auf den Menschen übertragen werden kann (BUSH and EVERETT 2001, LONGBOTTOM and COULTER 2003, HORN 2011). Kapitel 1.3 befasst sich eingehender mit dieser Spezies.

Die Arten *C. suis*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. caviae* und *C. felis* wurden bisher nur in Säugetieren nachgewiesen (EVERETT *et al.* 1999, HORN 2011). Über ihr zoonotisches Potential ist wenig bekannt; einzelne Fälle der Übertragung auf den Menschen wurden aber dokumentiert (LUTZ-WOHLGROTH *et al.* 2006, DEAN *et al.* 2013).

1.3 Die zoonotische Spezies *Chlamydia psittaci*

Der erste Fall eines Ausbruchs von Psittakose wurde Ende des 19. Jahrhunderts beschrieben. Bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts fanden immer wieder Ausbruchsgeschehen von Ornithose in Nordamerika und Europa statt, wobei der Erreger zunächst in Psittazinen und später auch in Tauben, Enten und Truthähnen nachgewiesen wurde. In den letzten Dekaden kam es vermehrt zu Ausbrüchen in Geflügelfarmen, wobei auch die Übertragung auf den Menschen nachgewiesen werden konnte (LONGBOTTOM and COULTER 2003, BEECKMAN and VANROMPAY 2009). In Vögeln kann *C. psittaci* akute, subakute, chronische oder subklinische Infektionen verursachen (LONGBOTTOM and COULTER 2003). Bis jetzt konnte *C. psittaci* in einer Vielzahl von Vogelarten nachgewiesen werden, jedoch sind in erster Linie Psittacidae (Papageien u.a.) und Columbiformes (Tauben) betroffen. Diese stellen somit als Haus- oder Zuchttiere und als freilebende Tiere das Hauptreservoir für die zoonotische Psittakose/ Ornithose dar. Die Übertragung von *C. psittaci* auf den Menschen findet in der Regel durch Inhalation von Aerosolen oder getrockneten Ausscheidungen infizierter Tiere statt, so dass vor allem Mitarbeiter von Geflügelfarmen und Tierhandlungen bzw. Züchter zu den Risikogruppen gehören (BEECKMAN and VANROMPAY 2009, LAROUCAU *et al.* 2009). Die Art *C. psittaci* umfasst sechs aviäre und zwei aus Säugetieren isolierte Serovare. Während die aviären Serovare leicht auf den Menschen übertragen werden können, ist das zoonotische Potential der Säugerserovare wesentlich geringer (BEECKMAN and VANROMPAY 2009). Die Übertragung von *C. psittaci* von Mensch zu Mensch ist umstritten.

Eine ***C. psittaci*- Infektion des Menschen** kann unauffällig aber auch mit schweren Komplikationen verlaufen. Jährlich sind in Deutschland ca. 15 bis 150 Personen betroffen (ROHDE *et al.* 2010). Die Inkubationsdauer beträgt fünf bis 14 Tage (BEECKMAN and VANROMPAY 2009). *C. psittaci* verursacht Symptome, welche von einem milden grippalen Infekt mit u.a. Fieber, Kopf-, Gelenk- und Muskelschmerzen bis zu einer schweren atypischen Pneumonie, begleitet von trockenem Husten und Atembeschwerden reichen (LONGBOTTOM and COULTER 2003). Zudem gibt es Berichte über systemische Infektionen, die von Endokarditis, Myokarditis, Glomerulonephritis, Hepatitis, Pankreatitis und Meningoenzephalitis begleitet werden können (JARIWALLA *et al.* 1980, ETIENNE *et al.* 1992, KORMAN *et al.* 1997, LAMAS and EYKYN 2003, FRAEYMAN *et al.* 2010, ROHDE *et al.* 2010) und bis zum Multi- Organ- Versagen führen können (HEDDEMA *et al.* 2006). Außerdem kam es bei Infektionen Schwangerer in seltenen Fällen zu einer Sepsis (WALTER *et al.* 2014). Gerade die Vielzahl der Symptome kann zu einer fehlerhaften Diagnosestellung durch den Arzt und damit zu einer möglicherweise unzureichenden Antibiotikatherapie führen. Daher ist es wichtig, während der Anamnese auch einen möglichen Kontakt zu Vögeln zu erfragen.

Die **Diagnostik von Chlamydien** kann über den direkten (Kultur, Nukleinsäureamplifikation) oder indirekten serologischen Nachweis erfolgen (PEELING and BRUNHAM 1996, ESSIG and MARRE 1997). Der kulturelle Nachweis dieser obligat intrazellulären Pathogene erfolgt durch Inokulation von Zellkulturen mit geeigneten Probenmaterialien, Inkubation und anschließender Evaluierung der Chlamydien- Einschlüsse mittels Immunfluoreszenzfärbung. Diese Methode ist sehr aufwändig und stellt strenge Anforderungen an das Probenmaterial (SACHSE *et al.* 2009b). Zusätzlich ist sie auf den Nachweis lebensfähiger Chlamydien beschränkt. Eine weitere direkte Nachweismethode erlaubt mittels PCR und nachfolgendem Microarray die Detektion von Chlamydien und zudem die Identifikation von Spezies und Genotyp (SACHSE *et al.* 2005, BOREL *et al.* 2008, SACHSE *et al.* 2009a). Indirekte Nachweisverfahren basieren auf der Detektion von Antikörpern gegen Chlamydien in Patientenmaterialien. Durch Kreuzreaktionen mit anderen Chlamydien-spezies können jedoch falsch- positive Resultate generiert werden.

Infektionen, welche durch intrazelluläre Pathogene wie Chlamydien verursacht werden, können mit **Antibiotika** therapiert werden, die sich durch eine effiziente intrazelluläre Anreicherung auszeichnen (HARTNETT and MARLIN 1976, MARTIN *et al.* 1985, DALHOFF 2005). Primär finden Tetrazykline (Doxycyclin, Tetrazyklinhydrochlorid) Anwendung. Sind diese nicht indiziert, werden Makrolide wie Azithromycin oder

Erythromycin eingesetzt. Beide Wirkstoffgruppen beeinträchtigen die bakterielle Translation (SENN *et al.* 2005, BEECKMAN and VANROMPAY 2009). Chinolone, welche die bakterielle DNA- Replikation inhibieren, werden ebenfalls zur Therapie von Chlamydieninfektionen angewendet.

Doxycyclin ist ein semi- synthetisches Antibiotikum und gehört zur Gruppe der Tetrazykline, die natürlicherweise durch *Streptomyces* synthetisiert werden (BAHRAMI *et al.* 2012). Sie binden an die 30S rRNA der Bakterien und blockieren somit die Bindestelle der Aminoacyl- tRNAs an den mRNA- Ribosomen- Komplex (JOSHI and MILLER 1997). Diese Interaktion ist reversibel, was die bakteriostatische Wirkung dieser Wirkstoffgruppe erklärt (CHOPRA *et al.* 1992).

Erythromycin gehört zur Gruppe der Makrolide, welche weitere Mitglieder wie Roxithromycin oder Azithromycin stellt und deren Grundgerüst von einem mehrgliedrigen Laktonring gebildet wird (DETTE 1980). Diese Antibiotika binden nahe des Peptidyltransferase- Zentrums der 50S ribosomalen Untereinheit (LOVMAR *et al.* 2004). Erythromycin blockiert dabei den Eintritt der naszierenden Peptidkette in den Exit- Tunnel des Ribosoms, wodurch kurze unfertige Peptidyl- tRNAs vom Ribosom dissoziieren (TENSION *et al.* 2003). Die Bindung des Erythromycins an die P- Stelle des Ribosoms ist reversibel, seine Wirkung daher bakteriostatisch. Durch den Einsatz hoher Konzentrationen kann jedoch eine bakterizide Wirkung erzielt werden (ZAROGOULIDIS *et al.* 2012).

Fluorchinolone sind synthetische Derivate des Chinolon- Grundgerüsts und besitzen ein namengebendes Fluoratom. Die Gruppe umfasst neben **Levofloxacin** u.a. Enrofloxacin und Ciprofloxacin und ist gegen ein breites Erregerspektrum wirksam (FISH 2003). Die Wirkung von Levofloxacin richtet sich v.a. gegen die bakterielle DNA- Gyrase. Durch Bindung an DNA/ DNA- Gyrase- Komplexe wird die Gyrase A- Untereinheit und somit das Schließen des bakteriellen Chromosoms nach Supercoiling inhibiert. Dadurch werden sowohl Reparaturprozesse der bakteriellen DNA, die bakterielle Replikation und Transkription blockiert, was nachfolgend zum Zelltod führt (ZHANEL *et al.* 2002). Das Ausbleiben der Reparatur zerstörter DNA führt zu der schnellen, bakteriziden Wirkung dieser Antibiotika (FISH 2003, VAN BAMBEKE *et al.* 2005).

Doch Chlamydien können gegenüber diesen Antibiotika **Resistenzen** entwickeln und so einer Therapie entgehen. Während phänotypisch resistente Patientenisolat bei Anzucht im Labor meist ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber Antibiotika verlieren (SANDOZ and ROCKEY 2010), können *in vitro* resistente Chlamydien durch Antibiotikadruck erzeugt werden. Tetrazyklin- resistente Chlamydien (*C. suis*) konnten bisher nur aus Schweinen

angezüchtet werden (SCHAUTTEET *et al.* 2013), wobei der Resistenzmechanismus durch ein *tet(C)*- Allel auf einer genomischen Insel, die nur bei *C. suis* nachgewiesen wurde, vermittelt wird (SUCHLAND *et al.* 2009) und auf einem erhöhten Efflux der Antibiotika aus der bakteriellen Zelle beruht (GRIFFIN *et al.* 2010). Resistenzen gegenüber Makroliden wie Erythromycin oder Azithromycin gehen meist mit einer Mutation des Gens für die chlamydiale 23S *rRNA* einher (MISYURINA *et al.* 2004, BINET and MAURELLI 2007, ZHU *et al.* 2010). Punktmutationen in sog. Chinolon- Resistenz- bestimmenden Regionen (quinolone- resistance determining regions, QRDRs) der chlamydialen Gene für Gyrase und Topoisomerase IV konnten als Ursache für die Resistenzentwicklung von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* gegenüber Chinolonen identifiziert werden (DESSUS-BABUS *et al.* 1998, MORRISSEY *et al.* 2002, YOKOI *et al.* 2004, RUPP *et al.* 2005).

Über die *in vitro* Empfindlichkeiten von *C. psittaci* gegenüber diesen Antibiotika ist bisher wenig bekannt (HIRAI and UNE 1986, KIMURA *et al.* 1993, NIKI *et al.* 1994, BUTAYE *et al.* 1997, MIYASHITA *et al.* 1997, DONATI *et al.* 1998, DONATI *et al.* 2002).

1.4 Chronische Chlamydieninfektionen - Grenzen von Diagnostik und Therapie

Neben den bereits beschriebenen akuten Chlamydieninfektionen, treten je nach Spezies verschiedene chronische Erkrankungen auf. Die genitalen Serovare von *C. trachomatis* können u.a. in den weiblichen oberen Genitaltrakt aufsteigen und dort Fibrose und Vernarbung der Eileiter verursachen, was wiederum zu ektopischen Schwangerschaften und Infertilität führen kann (HOGAN *et al.* 2004). Weiterhin werden Infektionen mit *C. trachomatis* aber auch mit *C. pneumoniae* mit reaktiver Arthritis assoziiert (HOGAN *et al.* 2004, RIZZO *et al.* 2012). Chronische *C. pneumoniae*- Infektionen werden mit der Verstärkung chronischer Grunderkrankungen wie COPD und Asthma sowie mit kardiovaskulären Erkrankungen und Störungen des zentralen Nervensystems assoziiert (BLASI *et al.* 2009).

C. psittaci steht im Verdacht, an der Exazerbation von COPD beteiligt zu sein (THEEGARTEN *et al.* 2004, THEEGARTEN *et al.* 2008). Außerdem gibt es in den letzten Jahren eine zunehmende Anzahl von Berichten, die eine Assoziation von chronischen *C. psittaci*- Infektionen mit der Entstehung von MALT- Lymphomen der okularen Adnexen postulieren (FERRERI *et al.* 2004, CHANUDET *et al.* 2006, FERRERI *et al.* 2008). Obwohl keine eindeutigen Beweise für die Mechanismen der Entstehung chronischer Chlamydieninfektionen existieren, deuten viele Indizien auf einen starken Zusammenhang mit persistenten Formen, wie sie *in vitro* erzeugt werden können, hin. So zeigte eine Studie von Whittington und Kollegen, dass es zu einem Therapieversagen genitaler *C. tracho-*

matis- Infektionen kam, welches weder durch Reinfektion durch unbehandelte Partner, mangelnde Therapie- Einhaltung oder ungenügende Bioverfügbarkeit des angewendeten Antibiotikums begründbar war (WHITTINGTON *et al.* 2001, MPIGA and RAVAOARINORO 2006a). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es bis zu fünf Jahre nach Standard- Antibiotikatherapie zu einem Aufflammen der Infektion durch denselben Genotyp kam (DEAN *et al.* 2000, SMITH *et al.* 2001). Auch der Nachweis von chlamydialen Nukleinsäuren oder erhöhten Antikörper- Titern bei gleichzeitigem kultur- negativen Ergebnis lässt die Annahme von persistenten, nicht- kultivierbaren Chlamydien *in vivo* zu (GRAYSTON and WANG 1975, BRUNHAM *et al.* 1985, HOLLAND *et al.* 1992, WYRICK 2010). Zur Bestimmung der Lebensfähigkeit der Chlamydien eignet sich RNA besser als DNA, da letztere auch nach einer erfolgreichen Therapie noch einige Zeit im Wirt verbleiben kann bis sie abgebaut wird (WYRICK 2010). Somit können durch DNA- basierte PCR-Verfahren falsch- positive Resultate generiert werden (RAHMAN *et al.* 1992, BEATTY *et al.* 1994d, GERARD *et al.* 1997, GERARD *et al.* 1998, HOGAN *et al.* 2004, WYRICK 2010). Jedoch kann man mittels dieser Methoden (Nukleinsäurenachweis kombiniert mit Zellkultur) keine eindeutige Abgrenzung einer chronisch- persistenten Chlamydieninfektion gegenüber einer sehr geringgradigen, inapparenten und mit Zellkulturverfahren nicht erfassbaren produktiven Infektion treffen (HOGAN *et al.* 2004). Ein weiteres Indiz für die Existenz chlamydialer Persistenz *in vivo* könnte der Nachweis aberranter chlamydialer Körperchen sein, welche den PBs, wie sie *in vitro* induziert werden können, ähnlich sind (BRAGINA *et al.* 2001, POSPISCHIL *et al.* 2009).

Diese Beobachtungen, aber auch die Vielzahl der Persistenzstimuli *in vitro* legen die Existenz persistenter, mit chronischen Infektionen assoziierte, chlamydialer Formen nahe. Ein möglicher Auslöser könnten insuffiziente Antibiotikatherapien sein, bei denen die Applikation subinhibitorischer Konzentrationen oder ungeeigneter Antibiotika (z.B. Penicillin) zur Bildung persistenter Chlamydien führt, welche phänotypisch resistent sind und zu einem Wiederaufflammen der Infektion nach Beenden der Antibiotikatherapie führen. Des Weiteren könnten Immunfaktoren des Wirts, wie das oben beschriebene IFN γ mit nachfolgender Degradierung von Tryptophan, einen persistenten Zustand *in vivo* auslösen. Versuche der Gruppen um Yang und Malinverni zeigten anhand infizierter asymptomatischer Mäuse, dass die Unterdrückung des Immunsystems durch Kortison zu einer Reaktivierung der Infektion führte (YANG *et al.* 1983, MALINVERNI *et al.* 1995). Durch solche wiederkeh-

renden Infektionen und nachfolgende inflammatorische Prozesse kann der Wirtsorganismus mehr und mehr beeinflusst werden, bis es zu irreparablen Schädigungen kommt.

Chronische Chlamydieninfektionen werden oft nicht erkannt, da sie symptomlos verlaufen können und daher keine entsprechende Diagnostik angefordert wird und sie mit den oben beschriebenen Zellkulturverfahren nicht detektierbar sind. Lediglich der Nachweis von chlamydialen Nukleinsäuren, vor allem der der RNA, in Kombination mit einem negativen Kulturergebnis kann Aufschluss über eine asymptomatische Infektion geben. Erschwerend kommt hinzu, dass chronische Chlamydieninfektionen i.d.R. an Stellen des Körpers lokalisiert sind (z.B. oberer Genitaltrakt, Gelenke), welche zur Entnahme von Proben schwer zugänglich sind (HAMMERSCHLAG 2002).

Steht die Diagnose einer chronischen Chlamydieninfektion fest, sollte eine Antibiotikatherapie folgen um die inflammatorischen und gewebeschädigenden Prozesse aufhalten zu können. Jedoch muss dabei in Betracht gezogen werden, dass chronische Chlamydieninfektionen weniger sensitiv auf eine antibiotische Therapie reagieren als akute Erkrankungen (HAMMERSCHLAG 2002). Durch Somani und Kollegen wurde gezeigt, dass *C. trachomatis*-Isolate, die von Patienten nach einer erfolglosen Antibiotikatherapie isoliert wurden, eine phänotypische Resistenz gegen verschiedene Wirkstoffgruppen mit unterschiedlichen Zielstrukturen aufwiesen, was auf einen globalen Resistenzmechanismus der Chlamydien wie die Persistenz hindeutet (SOMANI *et al.* 2000). Auch das spricht für den engen Zusammenhang zwischen chronischen Chlamydieninfektionen und Persistenz. Denn auch *in vitro* sind persistente Chlamydien im Vergleich zu replikativen Chlamydien besonders widerstandsfähig gegenüber einer antimikrobiellen Behandlung (KUTLIN *et al.* 1999, DRESES-WERRINGLOER *et al.* 2000, GIEFFERS *et al.* 2001, HAMMERSCHLAG 2002, WYRICK and KNIGHT 2004).

Die Gründe für die Widerstandsfähigkeit persistenter Chlamydien gegenüber Antibiotika sind eher hypothetischen Ursprungs. So könnte eine Konformationsänderung der chlamydialen Membran während der Persistenz (z.B. ein reduzierter MOMP- Gehalt) zu einer verringerten Aufnahme von Antibiotika in die chlamydiale Zelle und damit zu subinhibitorischen Konzentrationen darin führen (BEATTY *et al.* 1994d, SOMANI *et al.* 2000). Analog könnte die Wirtszellmembran aufgrund der Aktivierung verschiedener Signalwege weniger permeabel für die applizierten Antibiotika sein und daher die Bioverfügbarkeit des Antibiotikums in der Zelle sinken. Weiterhin könnte eine Reduktion des chlamydialen Metabolismus während der Persistenz für eine Verringerung der Zielstrukturen des jeweiligen Antibiotikums verantwortlich sein (GIEFFERS *et al.* 2001, WYRICK and KNIGHT 2004).

In vivo ist die Anwendung von Tetracyklinen, Makroliden bzw. (Fluor)Chinolonen zur Behandlung von akuten Chlamydieninfektionen i.d.R. erfolgversprechend (HAMMERSCHLAG 2002, SENN *et al.* 2005). Doch chronische Infektionen sind u.U. mit solch einer Monotherapie schwer zu eradizieren. Verschiedene Publikationen beschrieben jedoch, dass sich die Kombination von Antibiotika erster Wahl, welche in Kapitel 1.3 vorgestellt wurden, mit Rifampicin als wirkungsvolle Behandlungsstrategie erwies (JARIWALLA *et al.* 1980, WOLF and MALINVERNI 1999, CARTER *et al.* 2004, CARTER *et al.* 2010). Auch *in vitro* konnte bewiesen werden, dass Rifampicin eine sehr hohe Aktivität gegenüber Chlamydien besitzt (JONES *et al.* 1983, DRESESWERRINGLOER *et al.* 2001).

Rifampicin ist ein semi-synthetisches Derivat der Rifamycine (WEHRLI 1983). Es blockiert die bakterielle Transkription durch Inhibition der DNA-abhängigen RNA-Polymerase, wobei die Bindung von DNA an die Polymerase die Affinität für Rifampicin stark herabsetzt und die einmal begonnene Elongation des RNA-Strangs nicht beeinflusst wird (THORNSBERRY *et al.* 1983, WEHRLI 1983). Die Wirkung ist i.d.R. bakterizid, kann u.U. aber auch bakteriostatisch sein (THORNSBERRY *et al.* 1983). Von Rifampicin ist bekannt, dass es durch Mutation der RNA-Polymerase relativ zügig zu Resistenzentwicklung sowohl bei gram-positiven als auch gram-negativen Bakterien kommen kann (BRUMFITT *et al.* 1983, WEHRLI 1983). Auch Chlamydien können durch Mutation des *rpoB*-Gens die Bindekapazität von Rifampicin an die RNA-Polymerase herabsetzen und somit der bakterizidalen Wirkung des Antibiotikums entgehen (DRESESWERRINGLOER *et al.* 2003, SANDOZ and ROCKEY 2010). Daher wird dieses Antibiotikum in Kombination mit mindestens einem weiteren Antibiotikum angewendet, um die Selektion resistenter Bakterien zu vermeiden (BRUMFITT *et al.* 1983).

1.5 Mit einer pulmonalen Chlamydieninfektion gehen komplexe Entzündungs- und Umbauprozesse einher

Von einer zoonotischen *C. psittaci*-Infektion des Menschen ist i.d.R. zunächst die Lunge betroffen. Hierbei bilden die Epithelzellen der Mucosa die primären Zielzellen des Pathogens, deren Infektion eine Reihe von Entzündungs- und Umbauprozessen der Zellen und Gewebe zur Folge hat.

Lange Zeit ging man davon aus, dass die Zerstörung von Gewebe und seine Vernarbung auf die wiederholte Infektion mit Chlamydien und eine damit einhergehende Steigerung der Entzündungsreaktion zurückgeführt werden kann. Dabei spielen chlamydiale Antigene

eine tragende Rolle, welche während Reinfektionen oder chronischen Infektionen die adaptive Immunantwort des Wirts aktivieren. Jedoch sind die chlamydialen Antigene und die Mechanismen, welche letztlich zu den Entzündungsprozessen führen nicht eindeutig identifiziert. Daher wird dieses „immunologische Paradigma“ der Immunantwort und Pathogenese von Chlamydieninfektionen zunehmend von dem „zellulären Paradigma“ verdrängt (STEPHENS 2003). Rasmussen und Kollegen zeigten 1997, dass nach Infektion von Epithelzellen mit Chlamydien große Mengen pro- inflammatorischer Chemokine, u.a. IL-8, freigesetzt wurden (RASMUSSEN *et al.* 1997). Auch Molestina und Kollegen konnten dies 1999 bestätigen (MOLESTINA *et al.* 1999). *In vivo* wurden diese pro- inflammatorischen Chemokine in Mausmodellen der Chlamydieninfektion nachgewiesen (DARVILLE *et al.* 2001). Auch in Tränen bzw. endozervikalen Sekreten infizierter Patienten konnte ein erhöhter IL-8- Spiegel detektiert werden (STEPHENS 2003). Durch die chemotaktische Wirkung der Chemokine werden zunächst Zellen des angeborenen Immunsystems zum Ort der Infektion gelockt und weiterhin zur Proliferation angeregt. Diese zellulären Infiltrate können auch *in vivo* beobachtet werden (STEPHENS 2003). Die Freisetzung weiterer Zytokine (DESSUS-BABUS *et al.* 2002), Wachstumsfaktoren (COOMBES and MAHONY 2001, HESS *et al.* 2001) und anderer Marker (GOTH and STEPHENS 2001) durch infizierte Zellen legt nahe, dass neben Entzündungsprozessen auch Proliferation, Tissue- Remodeling und Vernarbung infizierten Gewebes angeregt werden (STEPHENS 2003). Nach Aktivierung der angeborenen, unspezifischen Immunantwort wird mit einiger Verzögerung ebenfalls die erworbene, spezifische Immunantwort mobilisiert. Durch diese ist bei einer wiederholten Chlamydieninfektion eine schnellere Reaktion des erworbenen Immunsystems möglich, was u.U. zu einem höheren Risiko des Vernarbens der Infektionsherde führen kann (STEPHENS 2003).

Dieses „zelluläre Paradigma“ der chlamydialen Pathogenese und klinische Veränderungen infolge einer Chlamydieninfektion konnten an einem kürzlich vorgestellten bovinen Modell der respiratorischen *C. psittaci*- Infektion gezeigt werden. Dieses Modell wurde am Friedrich- Loeffler- Institut (FLI) Jena durch die Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Reinhold etabliert und gemeinsam mit der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Liebler- Tenorio ausgewertet (LAMBERTZ 2011, MÖHLE 2011, REINHOLD *et al.* 2012, OSTERMANN *et al.* 2013a). Gegenüber Tiermodellen in Mäusen eröffnet das bovine Modell bessere Möglichkeiten hinsichtlich der Übertragung der Erkenntnisse auf den Menschen. So kommt die Anatomie der bovinen Lunge der humanen Lunge am nächsten und es lassen sich in der Humanmedizin etablierte Techniken

der Probengewinnung und Untersuchung anwenden. Aufgrund der Größe der Versuchstiere lassen sich geeignete Probenmaterialien (Abstriche, BALFs, Blut, Biopsien) mehrfach aus einem Tier gewinnen, was die Längsschnittuntersuchung einzelner Individuen ermöglicht (REINHOLD *et al.* 2012, KNITTLER *et al.* 2014, OSTERMANN *et al.* 2014). Jedoch ist durch die aufwändigere und teurere Haltung der Tiere ein geringerer Stichprobenumfang im Vergleich zu Mausmodellen möglich.

Initiale Untersuchungen an diesem bovinen Modell zeigten, dass eine Abhängigkeit zwischen der applizierten *C. psittaci*-Dosis und der Schwere der klinischen Zeichen besteht. Während die Inokulation von 10^6 IFUs je Tier an genau definierten Stellen der Lunge zu einer klinisch latenten und milden respiratorischen Infektion führte, konnte mit der Applikation von 10^7 bis 10^8 IFUs eine klinisch manifeste Infektion, welche durch Symptome einer Pneumonie gekennzeichnet war, ausgelöst werden (REINHOLD *et al.* 2012, OSTERMANN *et al.* 2013a, OSTERMANN *et al.* 2013b, OSTERMANN *et al.* 2014).

Dieses Modell der bovinen respiratorischen *C. psittaci*-Infektion mit Inokulation von 10^8 IFUs je Tier wurde durch die Arbeitsgruppen um Frau Prof. Dr. Reinhold und Frau Prof. Dr. Liebler-Tenorio über einen Zeitraum von fünf Wochen nach der Infektion untersucht (LAMBERTZ 2011, MÖHLE 2011, OSTERMANN *et al.* 2013a).

In der Frühphase, zwei bis drei Tage nach Inokulation, äußerte sich die Infektion durch eine akute Bronchopneumonie, welche durch den Influx neutrophiler Granulozyten in die Lunge gekennzeichnet war (LAMBERTZ 2011). Diese wurden durch pro-inflammatorische Zytokine, welche durch infizierte Alveolarepithelzellen gebildet wurden, angelockt (STEPHENS 2003, KNITTLER *et al.* 2014). Läsionen an den Inokulationsstellen waren an den Tagen drei und vier nach Infektion u.a. durch nekrotische Areale und eine steigende Anzahl von Alveolarmakrophagen charakterisiert (MÖHLE 2011, KNITTLER *et al.* 2014). An den Tagen sieben und zehn nach Infektion wurde die Veränderung der akuten zu einer subakuten, nekrotisierenden Bronchopneumonie beobachtet, deren Nekroseherde zunehmend von einer Regenerationszone aus Alveolarepithelzellen Typ II umgeben waren (LAMBERTZ 2011, MÖHLE 2011). Diese Regenerationszonen wurden zehn Tage nach Infektion von Dendritischen Zellen, Makrophagen, T- und B-Lymphozyten sowie Plasmazellen infiltriert, deren zunehmende Menge an Tag 14 nach Infektion auf eine starke lokale Immunantwort hinwies (KNITTLER *et al.* 2014). Zu diesem Zeitpunkt war die Infektion zu einer chronischen, nekrotisierenden Bronchopneumonie abgeklungen, deren Nekrosen durch Verkalkungen charakterisiert waren (LAMBERTZ 2011). Bis zu 14 Tage nach Infektion konnte *C. psittaci* aus Lungen infizierter Tiere angezüchtet (OSTERMANN *et al.*

2013a) bzw. mittels *23S rDNA*-PCR nachgewiesen werden (LAMBERTZ 2011). Dabei erfolgte der Nachweis zu Beginn der Infektion im Wesentlichen in Alveolarepithelzellen, im späteren Verlauf auch in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (KNITTLER *et al.* 2014). 35 bis 37 Tage nach Infektion hatte sich das Lungengewebe bis auf wenige, geringgradige bindegewebige Narben regeneriert (LAMBERTZ 2011, KNITTLER *et al.* 2014). Bis zu diesem Zeitpunkt konnten Chlamydien mittels immunhistologischer Methoden nachgewiesen werden (MÖHLE 2011).

Die humorale Immunantwort auf die respiratorische *C. psittaci*-Infektion war schwach ausgeprägt (OSTERMANN *et al.* 2013a), wohingegen die zellvermittelte Immunantwort von zentraler Bedeutung war (KNITTLER *et al.* 2014). Die beschriebene lokale Immunantwort war ausreichend, um die Chlamydien zu eliminieren (KNITTLER *et al.* 2014).

Diese komplexe Abfolge von inflammatorischen Prozessen erfordert eine aufeinander abgestimmte Sekretion und Expression von Zytokinen und Rezeptoren, welche für die Chemotaxis sowie die Bindung von Antigenen, Aktivierung und Proliferation von Zellen des angeborenen bzw. adaptiven Immunsystems notwendig sind. Auch das Passieren der Kapillar-Alveolar-Grenze durch Immunzellen sowie nekrotisierende und regenerierende Prozesse sind durch das Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren gekennzeichnet.

1.6 Zielstellung

Chronische Chlamydieninfektionen werden mit chlamydialer Persistenz *in vitro* assoziiert, können mit klassischen Zellkulturmethoden nicht nachgewiesen und nur unzureichend antibiotisch therapiert werden. Daher ist es unerlässlich, die Methoden zum Nachweis der persistenten Chlamydien zu verbessern sowie alternative Strategien der Antibiotikatherapie gegen diese besonders widerstandsfähigen chlamydialen Formen zu finden. Auch die Überwachung eines Therapieverlaufs sollte sich nicht ausschließlich auf Zellkulturmethoden oder die Detektion chlamydialer DNA stützen, sondern auf den Nachweis chlamydialer Transkriptionsaktivität und damit der Lebensfähigkeit der Chlamydien.

In der vorliegenden Arbeit sollten alternative Ansätze zur antibiotischen Behandlung persistenter *C. psittaci*-Infektionen untersucht werden. Diese Herangehensweise erforderte die Etablierung eines Persistenzmodells in Lungenepithelzellen, welche *in vivo* die primären Zielzellen für intrazelluläre, respiratorische Erreger darstellen. Das für diese Arbeit gewählte IFN γ -vermittelte Persistenzmodell ist für andere Chlamydienspezies aber auch *C. psittaci* (GOELLNER *et al.* 2006) bereits gut charakterisiert.

Da bisher wenig über die Antibiotika- Empfindlichkeit von *C. psittaci* bekannt ist, musste zur Erprobung alternativer Strategien der Antibiotikatherapie von persistenten *C. psittaci* zunächst die Minimale Hemmkonzentration (**minimal inhibitory concentration**, MIC) einiger Vertreter der normalerweise eingesetzten Antibiotikaklassen gegenüber der replikativen Infektion bestimmt werden. Da Fallberichte über chronische Chlamydienerkrankungen zeigten, dass Rifampicin ebenfalls eine positive Wirkung auf den Ausgang einer solchen Erkrankung hatte (JARIWALLA *et al.* 1980, CARTER *et al.* 2010), wurde für dieses Antibiotikum ebenfalls die MIC bestimmt. Es wurden Zellkulturassays etabliert, in denen replikative und persistente *C. psittaci* mit den einzelnen Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen behandelt wurden. Alternativ wurden Antibiotika erster Wahl mit Rifampicin kombiniert um eine bessere Eradikation der Chlamydien zu erreichen.

Wie in den Kapiteln 1.1 und 1.4 beschrieben, sind persistente Chlamydien aufgrund ihrer Eigenschaften mittels Zellkulturmethoden nicht zu detektieren. Jedoch lässt sich mittels Nachweis von mRNA ihre Lebensfähigkeit beurteilen. Daher sollte das Persistenzmodell hinsichtlich der differentiellen Transkription verschiedener chlamydialer Gene charakterisiert werden, die im weiteren Verlauf als Kandidatengene für das Monitoring einer antibiotischen Therapie von replikativen bzw. persistenten *C. psittaci*- Infektionen dienen sollten. Ein weiterer Aspekt befasste sich mit der Analyse von Wirtszellgenen, die während der replikativen bzw. persistenten *C. psittaci*- Infektion differentiell reguliert werden. Hierbei lag der Focus auf Genen, welche mit inflammatorischen bzw. tissue- remodeling- Prozessen assoziiert sind und daher *in vivo* eine große Rolle bei Entzündung und Regeneration spielen können. Die Expression solcher relevanter Gene sollte ebenfalls unter Antibiotikabehandlung untersucht werden um ggf. indirekte Rückschlüsse auf den Verlauf der Chlamydieninfektion ziehen zu können.

Schließlich sollten die in diesem Projekt gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich alternativer Strategien der Behandlung persistenter *C. psittaci* sowie der Analyse der differentiellen Expression chlamydialer und Wirtszell- Gene auf das bovine Modell der respiratorischen *C. psittaci*- Infektion übertragen werden, welches durch die Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Reinhold vom FLI Jena etabliert wurde (REINHOLD *et al.* 2012, OSTERMANN *et al.* 2013b).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung
A549 (ATCC® Number CCL-185™) BGM (African Green Monkey Kidney Cells)	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA bereitgestellt von Dr. Sachse, FLI Jena, D

2.1.2 Chlamydienstämme und weitere Mikroorganismen

Bakterien	Herkunft
<i>Chlamydia psittaci</i> DC15	Isolat aus einem abortierten Rinderfetus (GOELLNER <i>et al.</i> 2006), bereitgestellt von Dr. Sachse, FLI Jena
chemisch kompetente TOP10 <i>Escherichia coli</i>	TOPO® TA Cloning Kit, Invitrogen™, über life technologies, Darmstadt, D

Angaben zu Geräten/ Laborausstattung, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Medien, Puffern, Lösungen, Antibiotika, Kits, Antikörpern, Enzymen, Zytokinen, Nukleotiden, Primern, DNA- Markern sowie Software sind dem Anhang, Kapitel 11.1 zu entnehmen.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zellen

Für alle *in vitro* Experimente wurde die humane Adenokarzinomzelllinie A549 (ATCC® Number CCL-185™, American Type Culture Collection, Manassas, USA) verwendet, welche aus Lungengewebe etabliert (GIARD *et al.* 1973) und den Typ II alveolären epithelialen Zellen zugeordnet wurde (LIEBER *et al.* 1976).

Zur Titration rekultivierbarer Chlamydien und zur Titerbestimmung wurden BGM- Zellen verwendet. Diese wurden aus der Niere einer Afrikanischen Grünen Meerkatze isoliert und etabliert (BARRON *et al.* 1970) und weisen im Vergleich zu Mäusen, Hühnereiern oder anderen Zelllinien eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber Chlamydien auf (ARENS and WEINGARTEN 1981, HOBSON *et al.* 1982, VANROMPAY *et al.* 1992).

Die Kultivierung beider Zelllinien erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂ und ca. 95 % relativer Luftfeuchte. BGM- Zellen wurden stets in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Glutamin, 3,7 g/ l NaHCO₃ und 4,5 g/ l Glucose (Biochrom AG, Berlin, D) sowie 10 % fetalem Kälberserum (FCS; RELIA^{Tech} GmbH, Wolfenbüttel, D) kultiviert. A549- Zellen wurden je nach experimentellem Ansatz in Opti- MEM® I Reduced Serum Medium Glu-

taMAXTM (modifiziertes Eagle's Minimum Essential Medium; Gibco[®], über life technologies, Darmstadt, D) oder in DMEM, jeweils mit 10 % FCS supplementiert, kultiviert. Dadurch bedingte Unterschiede in der Sensitivität der Zellen gegenüber Chlamydien, Morphologie und Anzahl der chlamydialen Inklusionen sowie in der Produktivität der Chlamydien wurden zuvor ausgeschlossen.

Konfluente Monolayer wurden mit 1 x PBS (Gibco[®], über life technologies, Darmstadt, D) gespült und anschließend mit einer Trypsin/ EDTA- Lösung (0,05 %/ 0,02 %, in PBS, ohne Ca²⁺, Mg²⁺; Biochrom AG, Berlin, D) von der Zellkulturflasche abgelöst (A549 10 min, BGM 30 min Inkubation bei 37°C). Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von Medium mit 10 % FCS inaktiviert, die Zellen durch Zentrifugation (250 x g, 4 min, RT) pelletiert und im entsprechenden Medium mit 10 % FCS resuspendiert. Je nach vorgesehendem Experiment wurden die Zellen in entsprechender Dichte in Zellkulturgefäße ausgesät.

2.2.2 Anlegen von Kryokonserven der Zelllinien

Zellmonolayer wurden trypsiniert, pelletiert (siehe Kapitel 2.2.1) und vorsichtig in Medium mit 10 % FCS sowie ca. 7 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen aliquotiert, über Nacht bei -80°C eingefroren und in flüssigem Stickstoff (ca. -160°C) gelagert. Die Reaktivierung von kryokonservierten Zellen erfolgte durch eine rasche Erwärmung und umgehende Überführung in angewärmtes Medium mit 10 % FCS. Am Folgetag erfolgte ein Mediumwechsel um verbliebenes DMSO zu entfernen.

2.2.3 Infektion von Zellen mit *Chlamydia psittaci*

Für alle Experimente wurde *C. psittaci* DC15 verwendet, ein Isolat aus einem abortierten Rinderfetus, welches durch Dr. Sachse vom FLI Jena zur Verfügung gestellt wurde (GOELLNER *et al.* 2006). Dieser Stamm ist ein Säugerserovar und kann daher unter S2-Bedingungen gehandhabt werden.

Die Infektion von Zellen mit *C. psittaci* wurde für jedes Experiment nach dem gleichen Schema durchgeführt. Je nach Infektionsdosis (**multiplicity of infection**, MOI) wurde die entsprechende Menge Inklusionen- bildender Einheiten (**inclusion forming units**, IFUs; Bestimmung siehe Kapitel 2.2.4) im entsprechenden Volumen 1 x PBS aufgenommen. Für die Infektion wurden je nach Zellkulturgefäß und eingesetzter Infektionsdosis unterschiedliche Verdünnungen des *C. psittaci*- Stocks in entsprechenden Volumina hergestellt (siehe Tabelle 1). Ausgehend von 1 x 10⁵ IFUs je Deckglasröhrchen/ well einer 24- well- Platte, welches einer MOI von 1 (1 IFU je Zelle) entspricht, wurde die entsprechende Anzahl

benötigter IFUs für andere Zellkulturgefäße und variierende MOIs errechnet. Für Titrationen wurden verschiedene Verdünnungen der zu untersuchenden Chlamydiensuspension in 1 ml 1 x PBS hergestellt.

Tabelle 1: benötigte Anzahl IFUs für die Infektion von Zellen in verschiedenen Zellkulturgefäßen (MOI 1)

Anwendung/ Experiment	Zellkulturgefäß	Volumen	IFUs/ well
Fluoreszenzmikroskopie, Titration, MIC- Bestimmung	Deckglasröhrchen, well einer 24- well- Platte	1 ml	1×10^5
Analyse von Genexpression, DNA- Isolierung	well einer 6- well- Platte	3 ml	$7,5 \times 10^5$
Antibiotika- Assays	well einer 96- well- Platte	150 μ l	$1,8 \times 10^4$

Die Zellmonolayer wurden mit dem Inokulum überschichtet und anschließend bei 4000 x g und 37°C für 1 h zentrifugiert (Rotanta 460 RS, Hettich, Tuttlingen, D). Dieser Zentrifugationsschritt erhöht die Suszeptibilität der Zellen gegenüber den Chlamydien und damit die Infektionsrate (WEISS and DRESSLER 1960, PRUCKLER *et al.* 1999). Anschließend wurde das Inokulum entfernt und durch Medium mit 2 % FCS und ggf. den entsprechenden Zusätzen (IFN γ , Antibiotika) ersetzt. Die Inkubation erfolgte bei o.g. Bedingungen.

2.2.4 Vermehrung von Chlamydien zum Anlegen von Kryokonserven

Die Vermehrung der Chlamydien erfolgte in BGM- Zellen. Subkonfluente Zellrasen in T25- Zellkulturflaschen (Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen, D) wurden mit ca. 1×10^7 IFUs infiziert und für rund 24 h inkubiert (Kapitel 2.2.3).

Die Ernte der neugebildeten IFUs (EBs) erfolgte durch Ablösen des Zellrasens mit einem Zellschaber (Nunc* Cell Scraper, über Thermo Fisher Scientific, D) in wenig Kulturmedium. Die Zell- Chlamydien- Suspension wurde mit Erhaltungs- und Transportmedium (Medium A; *in house*), welches durch einen hohen Saccharoseanteil das Aufbrechen der Chlamydien während des Einfrierens verhindern soll, versetzt und anschließend für 30 sec mit einem Output von 80 sonifiziert (Branson Sonifier 250, BRANSON Ultraschall, Dietzenbach, D), um verbliebene Wirtszell- und Inklusionsmembranen aufzuschließen. Durch eine anschließende Zentrifugation bei 4000 x g für 3 min wurden Wirtszellbestandteile pelletiert. Der die EBs enthaltende Überstand wurde aliquotiert und bei - 80°C eingefroren. Die Bestimmung des Titors der Kryokonserven erfolgte durch die Infektion von BGM- Zellen mit seriellen 10- fach Verdünnungen gepoolter Aliquots, die Quantifizierung der IFUs via Fluoreszenzmikroskopie (Kapitel 2.2.5) und die anschließende

Berechnung der Zahl der EBs (IFUs)/ ml unter Berücksichtigung von Vergrößerungs- und Verdünnungsfaktor.

2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung infizierter Zellen

Epifluoreszenzmikroskopie

Zum entsprechenden Zeitpunkt wurde das Medium von den infizierten Zellrasen entfernt, diese mit 1 x PBS gewaschen, mit 100 % Methanol (AnalaR NORMAPUR, VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich) überschichtet und ca. 15 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Deckgläschen den Röhrchen (Sterilin[®] Limited über Thermo Fisher Scientific, D) oder 24- well- Platten (Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen, D; Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D) entnommen, getrocknet und mit Schnelleindeckmedium (Entellan[®], Merck KGaA, Darmstadt, D) auf Objektträger (Menzel- Gläser über Thermo FisherScientific, Braunschweig, D) aufgebracht.

Die anschließende Immunfluoreszenz- Färbung erfolgte mit dem Imagen[™] Chlamydia Kit (Oxoid Ltd, Ely, Cambridgeshire, UK). Dieses enthält Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierte monoklonale murine Antikörper gegen chlamydiales Lipopolysaccharid (LPS) sowie Evans Blue zur Kontrastfärbung der Zellen. Aufgrund des Probenaufkommens wurde die Menge des benötigten Antikörpers auf ca. ein Zehntel der Herstellerangaben reduziert und die Dauer der Inkubation bei 37°C in der feuchten Kammer auf ca. 1 h erhöht. Nach mehrmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die Präparate mit Mounting Fluid (im Kit) eingedeckt, um die Stabilität der Fluoreszenz zu gewährleisten. Die Auswertung erfolgte mit dem Epifluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss, Jena, D).

Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die Vorbereitung der Präparate erfolgte nach einem Protokoll der Gruppe um M. Knittler (FLI Tübingen/ Riems) (FIEGL *et al.* 2013). Das Medium wurde entfernt und die Präparate mit 1 x PBS gewaschen. Es folgte die Fixierung mit 2 % Paraformaldehyd (Sigma Aldrich Chemie, München, D) für 20 min bei RT auf einem Orbitalschüttler (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D). Die Zellmembranen wurden für 10 min bei RT auf dem Orbitalschüttler mit Waschpuffer (0,1 % Saponin in 1 x PBS) permeabilisiert und die Präparate mit Blockpuffer (3 % Bovines Serum Albumin in Waschpuffer) für 1 h bei RT auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem FITC- konjugierten Antikörper gegen chlamydiales LPS (1:2 in Blockpuffer verdünnt) für 1 h bei RT auf dem Orbitalschüttler. Zwischen den Schritten wurde mehrfach mit 1 x PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit einem Tropfen Mounting Fluid (ProLong[®] Gold antifade

reagent with DAPI, Invitrogen™, Darmstadt, D) auf einen Objektträger aufgebracht. Nach Aushärten des Mounting Fluids wurden die Präparate mit Nagellack versiegelt und dunkel gelagert. Die Auswertung erfolgte mit dem Axio Observer.Z1, LSM 5 Exciter und der ZEN- Software 2009 (Zeiss, Jena, D).

2.2.6 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA aus Zellkulturen wurde mit dem peqGOLD Tissue DNA Mini Kit (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D) isoliert. Hierzu wurde das Kulturmedium aspiriert, der Zellrasen mit 1 x PBS gewaschen und je well einer 6- well- Platte 400 µl DNA- Lysis- Buffer T zugegeben. Das Gesamtlisat wurde nach kurzer Lyse der Zellen in Mikrozentrifugenröhrchen überführt und bis zur weiteren Aufbereitung bei -80°C gelagert. Die DNA- Isolierung, inklusive RNase A- und Proteinase K- Verdau, erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll. Die genomische DNA wurde in 100 µl Nuklease- freiem Wasser eluiert und bei 4°C aufbewahrt. Konzentration und Reinheit wurden mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D) bestimmt.

2.2.7 Isolierung von Gesamt- RNA

Die Isolierung von RNA aus Zellkulturen erfolgte mit dem peqGOLD Total RNA Kit (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D). Dazu wurde das Kulturmedium entfernt, der Zellrasen vorsichtig mit 1 x PBS gespült und 400 µl RNA- Lysis- Buffer T je well einer 6- well- Platte zugegeben. Durch kurzes Inkubieren wurden die Zellen lysiert, das Lysat vollständig in Mikrozentrifugenröhrchen überführt und bis zur weiteren Aufbereitung bei -80°C eingefroren. Die Aufreinigung der RNA, inklusive des DNase I- Verdaus mit dem peqGOLD DNase I Digest Kit erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll. Die Elution erfolgte in 50 µl Nuklease- freiem Wasser. Die RNAs wurden bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch (Kapitel 2.2.6).

DNA- Kontaminationen der RNAs wurden durch eine PCR der synthetisierten cDNAs (Kapitel 2.2.8) für das eukaryotische *house- keeping- Gen PDH* ausgeschlossen. Die verwendeten Primer umschließen ein Intron, wodurch bei der Amplifikation von DNA ein größeres Fragment zu erwarten wäre.

2.2.8 Reverse Transkription der RNA

Die Reverse Transkription der isolierten RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mit Hilfe des Reverse Transcription System der Promega Corporation (Madison, USA) nach Herstellerangaben. Dieses System nutzt eine hochkonzentrierte AMV Reverse Transkriptase und einen rekombinanten RNasin® Ribonuclease Inhibitor. Für die Analyse chla-

mydialer Genexpression wurden random- Primer und für die Untersuchung humaner Genexpression oligo(dT)15- Primer verwendet. Es wurde je Reaktion 1000 ng Gesamt- RNA eingesetzt. Die Reverse Transkription wurde für 25 min bei 42°C durchgeführt, gefolgt von einer 5- minütigen Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 99°C und anschließender Lagerung bei 4°C. Für nachfolgende RT- PCR- Analysen wurde der cDNA- Reaktionsansatz 1:10 mit Nuklease- freiem Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.2.9 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Endpunkt- PCR

Die Endpunkt- PCR wurde zum Etablieren neuer Primerpaare, Generieren von Positivkontrollen und Verifizieren von Plasmidkontrollen eingesetzt. Der PCR- Ansatz setzte sich i.d.R. wie in Tabelle 2 angegeben zusammen. Mastermix, GoTaq®DNA Polymerase und dNTPs wurden über Promega Corporation (Madison, USA) bezogen.

Tabelle 2: Zusammensetzung eines Reaktionsmixes für die Endpunkt- PCR, Gesamtvolumen 25 µl (für Kolonie- PCRs wurden 10 µl Template und 7,375 µl H₂O eingesetzt)

Komponente	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
PCR- Mastermix	5 x	5 µl	1 x
dNTP- Mix	je 10 mM	0,5 µl	je 200 µM
Primer forward und reverse	je 10 µM	je 1 µl	je 400 nM
GoTaq®DNA Polymerase	5 U/ µl	0,125 µl	0,625 U
H ₂ O (Nuklease- frei)	-	12,375 µl	-
Template	-	5 µl	-

Das PCR- Profil entsprach dem in Tabelle 3 angegebenen Profil mit, je nach Fragestellung und Primerpaar, Abweichungen in Zyklenzahl und Annealingtemperatur.

Tabelle 3: PCR- Profil für Endpunkt- PCR

Phase	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
initiale Denaturierung	94°C	5 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	25 – 35
Annealing	54 - 65°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
finale Elongation	72°C	10 min	
Kühlung	4°C	∞	

Real- time (RT-) PCR

Im Gegensatz zur Endpunkt- PCR basiert die real- time PCR- Technologie auf der Interkalation eines Fluoreszenzfarbstoffes in die amplifizierte dsDNA und gibt durch Zunahme

der Fluoreszenzeinheiten über die Zeit hinweg die Zunahme der Amplifikate wieder. Somit ist eine Quantifizierung der Anzahl der Templates in einer Probe möglich. Die real-time PCR wurde zur relativen Quantifizierung von chlamydialen Genomäquivalenten in Gesamt-DNA infizierter Zellen oder zur Bestimmung der differentiellen Transkription chlamydialer Gene bzw. Wirtsgene in cDNA (real-time RT-PCR) angewendet.

Tabelle 4: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes für die real-time PCR, Gesamtvolumen 20 µl (* geringere Konzentration einiger Primerpaare, siehe Kapitel 11.2)

Komponente	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
KAPA SYBR FAST Mastermix	2 x	10 µl	1 x
Primer forward und reverse *	je 10 µM	je 0,4 µl	je 200 nM
H ₂ O (Nuklease- frei)	-	4,2 µl	-
Template (DNA, cDNA)	-	5 µl	-

Dazu wurde der SmartCycler[®] II (Cepheid, Maurens-Scopont, Frankreich) und der 2 x KAPA[™] SYBR[®] FAST QPCR MasterMix Universal (KAPABIOSYSTEMS, Boston, USA über PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D) eingesetzt. Dieser enthält alle PCR-Komponenten (Hot Start DNA-Polymerase, SYBR[®] Green I, MgCl₂, dNTPs). Der Reaktionsansatz wurde nach Tabelle 4 zusammengestellt und in SmartCycler[®]-Tubes (Cepheid, Sunnyvale, USA, über PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D) pipettiert. Es wurden 5 ng genomische DNA (1 ng/µl) bzw. 5 µl 1:10- verdünnte cDNA (entsprach ca. 25 ng RNA) eingesetzt.

Tabelle 5: PCR- Profil für real-time PCR

Phase	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95°C	60 – 120 sec	
Denaturierung	95°C	10 – 30 sec	siehe Tabellen 16 - 18
Annealing	siehe Tabellen 16 - 18	15 – 20 sec	
Elongation	72°C	10 – 30 sec	
Schmelzkurve	60 – 95°C	0,2 K/ sec	

Das Profil der real-time PCR ist in Tabelle 5 angegeben, wobei auch hier Zyklenzahl und Annealingtemperatur je nach Primerpaar variierten. Die Sequenzen der Primerpaare mit entsprechenden Annealingtemperaturen, Zyklenzahlen und erwarteten Fragmentlängen sind in den Tabellen 16 bis 18 im Anhang, Kapitel 11.2 angegeben.

Die CT- Werte (Zykluszahl, bei der ein definierter Fluoreszenzgrenzwert erreicht wird), wurden zur Berechnung der differentiellen Expression verwendet (Kapitel 2.2.10).

2.2.10 Auswertung der differentiellen Genexpression

Die Analyse der differentiellen Expression von chlamydialen Genen ist dahingehend erschwert, dass es faktisch kein *house-keeping*- Gen gibt, welches unter allen Umständen (u.a. Persistenz der Infektion, Antibiotikaeinfluss) konstant transkribiert wird. Daher wurde in dieser Arbeit gegen chlamydiale DNA aus parallel gewonnenen Proben normalisiert, wie es bereits von anderen Gruppen als adäquate Möglichkeit vorgestellt wurde (OUELLETTE *et al.* 2005, ENGSTROM *et al.* 2010). Hierbei wurde der CT- Wert für das *gyrA*- Gen aus genomischer DNA als Referenzwert bestimmt, gegen den die Transkription jedes Zielgens nach einer modifizierten Methode von Kokab und Kollegen (KOKAB *et al.* 2010) errechnet wurde (Formel 1).

$$\text{relative Genexpression} = 2^{-(CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}})} \quad (1)$$

CT = Cycle Threshold
 Zielgen = Gen, dessen differentielle Expression bestimmt werden soll
 Referenzgen = Gen, gegen das normalisiert wird
 (chlamydiales *gyrA* aus DNA, humanes und bovines *GAPDH* aus cDNA)

Diese Formel berechnet für einen Zustand (z.B. persistente Infektion) die Differenz aus den CT- Werten des Zielgens (cDNA) und des Referenzgens (*gyrA*- DNA) und errechnet daraus die relative Expression des Zielgens im Vergleich zu chlamydialer DNA.

Zum Vergleichen verschiedener Zustände (z.B. replikative vs. persistente Infektion) wurde das Verhältnis der relativen Expressionen eines Zielgens gebildet (= ratio; Formel 2).

$$\text{ratio} = \frac{\text{relative Expression}_{\text{Behandlung}}}{\text{relative Expression}_{\text{Kontrolle}}} \quad (2)$$

Behandlung = z.B. IFN γ - Behandlung, Antibiotika- Behandlung, Infektion mit *C. psittaci*
 Kontrolle = z.B. ohne IFN γ , keine Antibiotika- Behandlung, nicht-infizierte Zellen

Für die Expression von Wirtszellgenen wurde gegen humanes bzw. bovines *GAPDH* aus RNA/ cDNA, welches als *house-keeping*- Gen anerkannt ist, normalisiert. Die Untersuchungen fanden ausschließlich auf Ebene der RNA/ cDNA statt, jedoch wurden analog die Formeln 1 und 2 angewendet, wobei *GAPDH*- cDNA als Referenzgen eingesetzt wurde.

2.2.11 Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion von Amplifikaten

Die Agarosegelelektrophorese diente zum Auftrennen von Amplifikaten der Endpunkt-PCR. Dazu wurden, je nach Größe des PCR- Fragments, 1- bis 4 prozentige Gele mit 1 x TAE- Puffer (50 x TAE- Puffer von Thermo Scientific, Vilnius, Litauen) hergestellt.

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte i.d.R. bei 80 – 100 Volt (Wide Mini-Sub[®] Cell GT System und PowerPac 200 Power Supply, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D) für 30 bis 60 min. Anschließend wurde das Gel in einer 0,1% igen Ethidiumbromid- Lösung (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) für ca. 10 min bei RT inkubiert und 20 min im Wasserbad entfärbt. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe der Geldokumentationsanlage ImageMaster[®] VDS (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden).

Ggf. wurden die Fragmente mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D) nach Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert. Die DNA wurde in 30 µl Nuklease- freiem Wasser eluiert und abhängig von der weiteren Verwendung (Klonierung bzw. Sequenzierung) in der DNA SpeedVac[®] DNA 110 (Savant Instruments, Inc., Farmingdale, USA) auf ca. 10 – 12 µl eingeengt.

2.2.12 Klonieren chlamydialer, humaner und boviner Genfragmente

Chlamydiale, humane sowie bovine Genfragmente wurden kloniert, um PCR- Positivkontrollen zu generieren.

Für die Erstellung der Positivkontrollen für chlamydiale Gene diente chlamydiale genomische DNA als Vorlage. Für die Positivkontrollen humaner bzw. boviner Gene diente cDNA der entsprechenden Quelle (A549- Zellen bzw. BALFs von *Bos taurus*) als Template. Die PCR- Produkte (Kapitel 2.2.9) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und Banden der jeweils entsprechenden Größe aus dem Agarosegel extrahiert (Kapitel 2.2.11). Zur Klonierung wurde das TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen[™], über life technologies, Darmstadt, D) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach einem durch Svea Sachse modifiziertem Herstellerprotokoll (mündliche Mitteilung). 4 µl des PCR- Produkts wurden mit 1 µl Salt Solution und 1 µl pCR[®]2.1- TOPO[®]- Vektor versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Dieser Ansatz wurde vollständig zu auf Eis aufgetauten, chemisch kompetenten *Escherichia coli* One Shot[®] TOP 10 (im Kit) gegeben, 20 min auf Eis und anschließend 30 sec bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Den transformierten *E. coli* wurden rund 150 µl angewärmtes S.O.C.- Medium (im Kit) zugegeben und für 1 h bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde auf LB- Agar- Platten mit je 50 µg/ ml Ampicillin und Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag erfolgte das Ansetzen von Kulturen für die Minipräparation von Plasmiden sowie die Durchführung einer Kolonie- PCR (Kapitel 2.2.9). Dazu wurden je Platte mehrere Kolonien gepickt, in je 10 µl Nuklease- freiem Wasser abgestreift und anschließend in 2 ml LB- Medium mit je 50 µg/ ml Ampicillin und Kanamycin gegeben. Die

Kulturen wurden über Nacht bei 37°C und 150 rpm im Schüttelinkubator (Edmund Bühler GmbH, Tübingen, Deutschland) inkubiert.

2.2.13 Isolierung von Plasmiden

Plasmide, welche als PCR- Positivkontrollen dienten, wurden in *Escherichia coli* TOP10 vermehrt und mittels Mini- bzw. Midipräparation aufgereinigt. Kulturen für Minipräparationen wurden wie in Kapitel 2.2.12 beschrieben in Selektivmedium angelegt. Von ein bis zwei in der Kolonie- PCR positiven Kulturen wurde eine Minipräparation durchgeführt. Dazu wurden die Bakterien zunächst bei 10.000 x g für 1 min pelletiert und anschließend in 250 µl Lösung I mit RNase A des peqGOLD Plasmid Mini-prep Kit I (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D) resuspendiert. Die weitere Aufreinigung der Plasmide erfolgte gemäß den Herstellerangaben des Kits. Die Elution der Plasmide erfolgte in 100 µl Nuklease- freiem dH₂O, die Lagerung bei -20°C.

Größere Mengen Plasmide wurden mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D) aufgereinigt. Hierzu wurden die Bakterien für 10 min bei 5000 x g pelletiert und in 500 µl Lösung I mit RNase A aufgenommen. Die weitere Aufreinigung erfolgte wiederum nach den Herstellerangaben und entsprach der des Mini-prep Kit I.

2.2.14 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mit der Kettenabbruch- Methode nach Sanger (SANGER *et al.* 1977) unter Verwendung des BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits und des ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (beides Applied Biosystems[®], über life technologies, Darmstadt, D). Durch diese Methode wurden die Positivkontrollen verifiziert.

Aus dem Gel extrahierte PCR- Fragmente (Kapitel 2.2.11) wurden entsprechend Tabelle 6 in den Sequenz- PCR- Reaktionsmix eingesetzt.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Sequenz- PCR- Ansatzes, Volumen 10 µl

Komponente	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
BigDye [®] Terminator Reaktionsmix	-	2 µl	-
Sequencing Buffer (im Kit)	5 x	2 µl	1 x
Primer forward oder reverse	10 µM	1 µl	1 µM
Template	-	5 µl	-

I.d.R. wurde je Fragment je eine Sequenz- PCR mit forward und reverse Primer angesetzt und mit dem in Tabelle 7 angegebenen Profil durchgeführt.

Tabelle 7: PCR- Profil für Sequenz- PCR

Phase	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturierung	95°C	20 sec	30
Annealing	55°C	10 sec	
Elongation	60°C	4 min	
Kühlung	4°C	∞	

Die Fällung der Fragmente durch Zugabe von 1 µl Natriumacetat- EDTA und 38 µl absoluten Ethanol schloss sich an, gefolgt von einem 15- minütigen Zentrifugationsschritt bei 12.000 x g und RT. Der Überstand wurde verworfen und das DNA- Pellet mit 700 µl eiskaltem 70% igen Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 12.000 x g, RT) wurde der Überstand verworfen und das DNA- Pellet durch kurzzeitige Vakuumzentrifugation getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 20 µl Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems®, über life technologies, Darmstadt, D) aufgenommen, gevortext, bei 96°C für 2 min denaturiert und danach sofort auf Eis gegeben. Die Sequenzierung im ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer erfolgte in speziellen 96- well- Platten (Applied Biosystems®, über life technologies, Darmstadt, D).

2.2.15 Gewinnung und Bearbeitung der Proben des Tierversuchs

Studiendesign

Inokulation, Antibiotikabehandlung, Überwachung und Sektion der untersuchten Tiere wurde durch das Personal vom FLI Jena durchgeführt. Die Kälber der Rasse Holstein-Friesian waren zum Zeitpunkt der Inokulation ca. 6 bis 8 Wochen alt sowie klinisch unauffällig (PROHL *et al.* 2015b). Allen Tieren wurden an definierten Inokulationsstellen in Lunge und Nase jeweils insgesamt 10⁸ IFUs des *Chlamydia psittaci* Stammes DC15 appliziert (REINHOLD *et al.* 2012, PROHL *et al.* 2014). Da für den gesamten Tierversuch 90 Tiere zur Verfügung standen und verschiedene antibiotische Behandlungsstrategien untersucht werden sollten, ergab sich je Behandlungsschema ein Stichprobenumfang von sechs bis sieben Tieren (Tabelle 8). Die Behandlungen starteten 36 bzw. 48 h p.i. und wurden bis 13 dpi durchgeführt (PROHL *et al.* 2015a, 2015b).

In der ersten Versuchsserie (Februar bis Juni 2012) wurde die Wirkung des Tetrazyklins Doxycyclin (Präparat Centidox) in 2 verschiedenen Dosen (5 mg bzw. 10 mg je kg Körpergewicht und Tag) sowie deren Kombination mit Rifampicin (600 mg; Präparat Eremfat) untersucht. Doxycyclin wurde zwei mal täglich ab 36 h p.i. oral verabreicht, während die intravenöse Gabe von Rifampicin 48 h p.i. startete (PROHL *et al.* 2015b).

Tabelle 8: Behandlungsstrategien des Kälbersversuchs; Azi = Azithromycin, Doxy = Doxycyclin, Enro = Enrofloxacin, Ery = Erythromycin, Rif = Rifampicin

nicht- infizierte Tiere: 11/ 2011 und 06 – 08/2014				
n = 3 und 4				
1. Versuchsserie: 02/ 2012, 03/ 2012, 06/ 2012				
Doxy, 5 mg	Doxy, 10 mg	Doxy, 5 mg + Rif, 600 mg	Doxy, 10 mg + Rif, 600 mg	unbehandelt
n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6
2. Versuchsserie: 02/ 2013, 03/ 2013				
Enro	Enro + Rif	Rif		unbehandelt
n = 6	n = 6	n = 6		n = 2
3. Versuchsserie: 10/ 2013, 11/ 2013, 12/ 2013				
Ery	Ery + Rif	Azi	Azi + Rif	unbehandelt
n = 6	n = 6	n = 7	n = 6	n = 5

Die zweite Versuchsserie (Februar bis März 2013) untersuchte die Wirkung des Chinolons Enrofloxacin (Präparat Baytril), seiner Kombination mit Rifampicin sowie von Rifampicin allein auf die respiratorische Chlamydieninfektion. Die Behandlung mit Enrofloxacin startete 30 h p.i. Initial wurden 7 mg Baytril je kg Körpergewicht subkutan appliziert, während danach 5 mg je kg Körpergewicht und Tag verabreicht wurden. Die Gabe von Rifampicin wurde wie oben beschrieben durchgeführt (PROHL *et al.* 2015a).

Die dritte Versuchsserie (Oktober bis Dezember 2013) betrachtete die Wirkung der Makrolide Erythromycin und Azithromycin sowie deren Kombinationen mit Rifampicin. Azithromycin (Präparat Zithromax) wurde erstmalig mit 10 mg je kg Körpergewicht und weiterhin mit 6 mg je kg Körpergewicht und Tag oral verabreicht. Die Behandlung startete 36 h p.i. Erythromycin (Präparat Erythrocylin) wurde ab 30 h p.i. subcutan mit 12 mg je kg Körpergewicht und Tag angewendet. Die zusätzliche Behandlung mit Rifampicin erfolgte wie oben angegeben (PROHL *et al.* 2015a).

Material (BALFs und Gewebe) von nicht- infizierten Kontrolltieren wurden im November 2011 bzw. Sommer 2014 gewonnen.

Probenmaterial und Gewinnung der Proben

Die Gewinnung und Bereitstellung der Proben fand durch A. Prohl, C. Ostermann und M. Lohr der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Reinhold vom FLI Jena statt.

Zu den Zeitpunkten 4 dpi, 9 dpi und 14 dpi erfolgte die Gewinnung von Bronchoalveolärer Lavage (**bronchoalveolar lavage fluid**, BALF) aus dem Hauptbronchus der linken Lunge

(PROHL *et al.* 2014). Diese Beprobungen wurden endoskopisch *in vivo* (4 und 9 dpi) bzw. *ex vivo* (14 dpi) durchgeführt. BALFs wurden durch Spülen der Lunge mit insgesamt 100 ml physiologischer Kochsalzlösung gewonnen, wovon diesem Projekt ca. 15 ml zur Verfügung gestellt wurden.

Des Weiteren wurden zum Zeitpunkt der Euthanasierung je Lunge 2 Gewebebiopsien entnommen, welche zum einen einem makroskopisch veränderten Entzündungsherd (Ort der Applikation von *C. psittaci*) und zum anderen makroskopisch gesundem Gewebe nahe einem Entzündungsherd entnommen wurden. Ihre Lagerung erfolgte bei -160°C.

BALFs wurden am Tag der Entnahme auf Eis in das Institut für Medizinische Mikrobiologie transportiert und dort sofort aufgearbeitet. Der Transport der Biopsien erfolgte am Ende einer Versuchsserie in Trockeneis.

Präparation von Nukleinsäuren aus Probenmaterial

Die in den BALFs enthaltenen Zellen wurden durch Zentrifugation bei 400 x g und 4°C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde in ein sauberes Röhrchen dekantiert und die Zellpellets je nach Größe in 500 µl oder mehr Überstand resuspendiert, so dass eine homogene Zellsuspension entstand. Für die RNA-/ DNA-Isolierung wurden ≥ 400 µl der Zellsuspension in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt, das verbliebene Volumen wurde als Rückstellprobe ebenfalls in ein Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert. Beide Röhrchen wurden bei 420 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Zu der RNA-/ DNA- Probe wurden 400 µl RNA- Lysis-Buffer T des peqGOLD Total RNA Kit gegeben und die Lysate wurden bei -80°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Die Zellpellets der Rückstellproben wurden ohne Puffer bei -80°C gelagert.

Die Isolierung der RNA inklusive DNase I- Verdau auf der Membran erfolgte nach den Herstellerangaben des peqGOLD Total RNA Kit wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben. Ggf. wurde das Volumen des Lysepuffers zur effizienteren Lyse erhöht. Die RNA wurde in 50 µl Nuklease- freiem Wasser eluiert und ihre Konzentration mittels NanoDrop bestimmt. Für die Reverse Transkription wurden bei ausreichend hoher Konzentration 1000 ng RNA eingesetzt, ansonsten das maximal mögliche Volumen RNA. Die Reverse Transkription erfolgte mit random- Primern, jedoch wurde, nach vorherigem Ausschluss einer niedrigeren Effizienz, die Anzahl der eingesetzten Einheiten der AMV Reversen Transkriptase auf 7,5 U je Reaktion heruntersgesetzt (Kapitel 2.2.8).

Von den DNA Removing Columns des RNA- Isolierungs- Kits wurde die genomische DNA isoliert. Dazu wurden 400 µl DNA- Lysis- Buffer T des peqGOLD Tissue DNA

Mini Kit auf die Säulen pipettiert, für 10 min bei RT inkubiert und anschließend bei 12.000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 15 µl RNase A und 20 µl Proteinase K versetzt und nach den Herstellerangaben weiterbearbeitet (Kapitel 2.2.6). Die Elution erfolgte in 100 µl Nuklease- freiem Wasser.

Die differentielle Genexpression boviner Gene wurde mittels real- time RT- PCR analog zu den *in vitro* Protokollen bestimmt (Kapitel 2.2.9 und 2.2.10). Für die real- time RT-PCR wurden 5 µl 1:10- verdünnter cDNA eingesetzt. Für einige Primerpaare wurde deren Konzentration in der PCR- Reaktion reduziert, um die Bildung unspezifischer Amplifikate zu minimieren (siehe Tabelle 18 im Anhang, Kapitel 11.2).

Die Aufarbeitung von Gewebebiopsien der 1. und 2. Versuchsserie wurde im Rahmen einer Masterarbeit von Saskia Lindner etabliert (LINDNER 2013). Gewebebiopsien von Tieren der 3. Versuchsserie sowie nicht- infizierter Tiere wurden im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet und publiziert (PROHL *et al.* 2015c).

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines durch Interferon- γ induzierten Persistenzmodells für *Chlamydia psittaci* in A549- Zellen

3.1.1 IFN γ verringert die Infektivität von *Chlamydia psittaci*

Zur Etablierung des IFN γ -vermittelten Persistenzmodells von *C. psittaci* in A549- Zellen wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinantem humanen IFN γ behandelt. Zunächst wurden die Zellen 24 h vor der Infektion mit verschiedenen Konzentrationen IFN γ (200 bzw. 300 U/ ml) vorbehandelt. Nach Infektion mit *C. psittaci* (MOI 1) erfolgte die Inkubation mit aufsteigenden IFN γ - Konzentrationen (100 bis 500 U/ ml). Zusätzlich wurden Kontrollen ohne IFN γ - Behandlung mitgeführt. Nach 24- stündiger Inkubation wurden die Inklusionen fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert und die Anzahl replizierbarer Chlamydien (EBs) durch Titration auf BGM- Zellen bestimmt. Da chlamydiale Persistenz durch lebensfähige, nicht-infektiöse Bakterien definiert wird (BEATTY *et al.* 1994d), wurde die IFN γ - bedingte Reduktion der Burst Size, also der neu gebildeten EBs je Inklusion, als maßgebliche Größe zur Etablierung des Persistenzmodells für *C. psittaci* herangezogen.

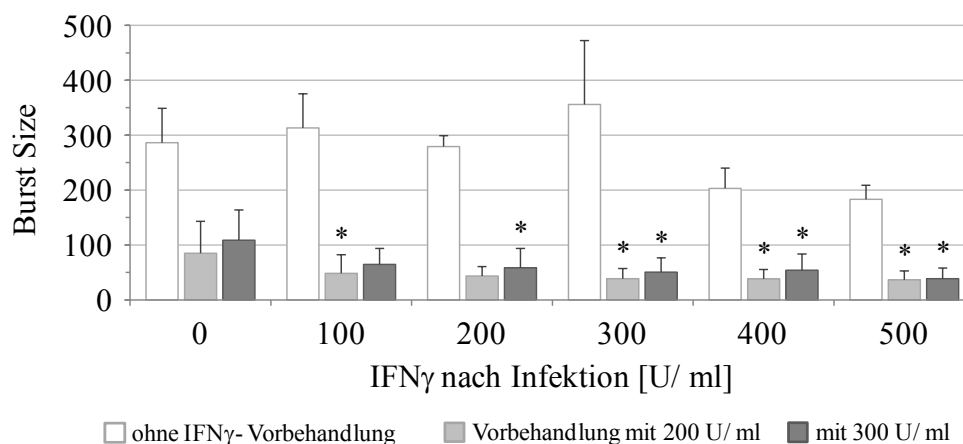


Abbildung 3: Etablierung des IFN γ -vermittelten Persistenzmodells für *C. psittaci* in A549-Zellen; Abnahme der Burst Size 24 h nach Infektion nach (Vor) Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen IFN γ (\pm SEM); Sterne über den Säulen: Signifikanz gegenüber der IFN γ - unbehandelten Kontrolle (= replikative Infektion, ganz linke Säule); zweiseitiger Student's T- Test: * $p < 0,05$

Abbildung 3 zeigt die Burst Size von *C. psittaci* in Abhängigkeit der angewendeten IFN γ - Konzentration. In der replikativen Infektion ohne IFN γ - (Vor) Behandlung konnte eine

Burst Size von ca. 300 EBs/ Inklusion erzielt werden. Die Behandlung von A549- Zellen vor der Infektion führte zu einer Reduktion um zwei Drittel auf ca. 100 EBs/ Inklusion ($p < 0,05$). Eine weitere Verringerung der EBs je Inklusion konnte durch die zusätzliche IFN γ - Behandlung nach Infektion erreicht werden. Die Vorbehandlung mit 200 U IFN γ / ml und die Behandlung nach Infektion mit der gleichen Konzentration hatte eine Reduktion der Burst Size um 85 % gegenüber der replikativen Infektion zur Folge. Durch Erhöhung der IFN γ - Konzentration konnte keine weitere signifikante Verringerung der Burst Size erzielt werden. Daher wurde für alle weiteren Experimente die IFN γ - Konzentration von 200 U/ ml vor und nach Infektion zur Induktion der Persistenz von *C. psittaci* eingesetzt.

3.1.2 Charakterisierung von Anzahl und Morphologie der Inklusionen sowie der Produktivität von replikativen und persistenten *Chlamydia psittaci*

In diesem Kapitel werden replikative und persistente *C. psittaci* hinsichtlich der Bildung rekultivierbarer Chlamydien und der Zahl und Morphologie ihrer Inklusionen über einen längeren Zeitraum bis zu 72 h nach Infektion verglichen (Abbildung 4). Die Experimente wurden mit MOI 1 in Deckglasröhrchen durchgeführt. Intrazelluläre rekultivierbare EBs wurden durch Zerstörung des Zellrasens gewonnen und titriert, während extrazelluläre EBs durch Überführen des Zellkulturüberstandes auf BGM- Zellen quantifiziert wurden (Abb. 4.C). Inklusionen wurden durch Epifluoreszenzmikroskopie quantifiziert (Abb. 4.A) und durch Laser Scanning Mikroskopie (LSM) dargestellt (Abb. 4.B).

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel demonstriert, unterschied sich die Zahl der Inklusionen in der replikativen und der persistenten *C. psittaci*- Infektion signifikant ($p < 0,01$). Während die Anzahl der Inklusionen in der replikativen Infektion bis zum Zeitpunkt 72 h p.i. auf ca. 150.000 je Deckglasröhrchen zunahm, blieb sie in der persistenten Infektion weitestgehend konstant bzw. nahm zum Zeitpunkt 72 h p.i. auf ca. 10.000 Inklusionen je Deckglasröhrchen ab (Abb. 4.A).

Auch die Morphologie replikativer bzw. persistenter Inklusionen unterschied sich ab dem Zeitpunkt 24 h p.i. deutlich voneinander (Abb. 4.B). In der replikativen Infektion (Abb. 4.B, obere Reihe) zeigten sich auch bei geringer Vergrößerung sehr große, deutlich abzugrenzende Inklusionen, welche dicht mit EBs und RBs gefüllt waren und zum Teil den Zellkern der Wirtszelle verdrängten oder umschlossen. Der Anteil infizierter Zellen nahm im Verlauf der Zeit zu, während die Entwicklung aller Inklusionen zunehmend asynchron verlief. Dies wird ausgelöst durch Reinfektion bisher nicht- infizierter Zellen durch eine zunehmende Anzahl neu gebildeter und freigesetzter EBs (vgl. Abb. 4.C).

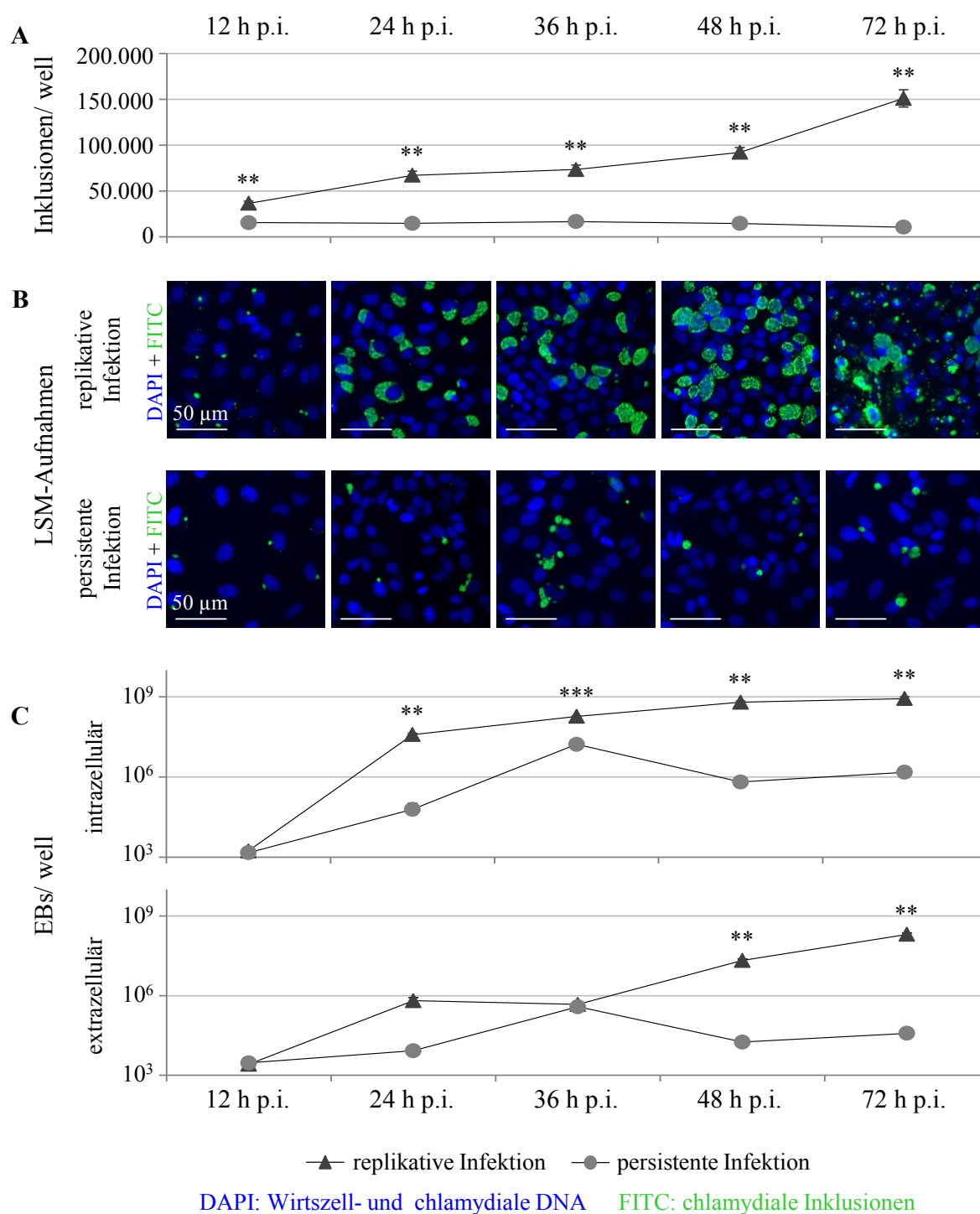


Abbildung 4: Anzahl und Morphologie der Inklusionen und Produktivität replikativer und persistenter *C. psittaci*; Anzahl der Inklusionen (A) und der neugebildeten EBs (C) je well (\pm SEM) sowie LSM- Aufnahmen replikativer bzw. persistenter *C. psittaci*- Infektionen (B) zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion; Sterne: signifikante Unterschiede zwischen persistenter und replikativer Infektion; n = 3 (Inklusionen) bzw. 4 (rekultivierbare EBs); zweiseitiger Student's T- Test: ** p < 0,01, *** p < 0,001

Je länger die replikative Infektion andauerte, desto asynchroner verlief die Entwicklung der einzelnen Inklusionen und umso mehr Entwicklungsstadien chlamydialer Inklusionen ließen sich 72 h p.i. erkennen. Neben wenigen klar umrissenen Inklusionen, die typisch für einen Zeitpunkt zum Ende des Entwicklungszyklus sind, ließen sich kleine, junge Inklusionen, welche aus Reinfektionen stammen, und große, weniger klar umrissene Strukturen, welche ihren Ursprung in reifen, geplatzten Inklusionen haben könnten, nachweisen. Außerdem ließen sich viele extrazelluläre Antigenreste erkennen, welche mglw. EBs oder deren Bruchstücke darstellen. Da zu diesem Zeitpunkt jede bis dahin noch intakte Zelle infiziert war, würde über die Inkubationsdauer hinaus die Zahl der Inklusionen sowie der intrazellulären infektiösen Chlamydien abnehmen, während die Zahl der EBs im Überstand eine Plateauphase erreichen würde. Dadurch wäre die Infektion eines Zellrasens mit Chlamydien in einem umgrenzten Zellkulturgefäß selbstlimitierend.

In der persistenten Infektion (Abb. 4.B, untere Reihe) ließen sich zum Zeitpunkt 36 h p.i. einige relativ große und mit EBs gefüllte Inklusionen erkennen, welche für die Zunahme der Anzahl der EBs in Zellen und Überständen (vgl. Abb. 4.C) verantwortlich waren. Wie bereits in Kapitel 3.1.1 beschrieben, ließ sich mit $\text{IFN}\gamma$ keine vollständige Reduktion der Bildung von infektiösen Chlamydien erreichen. Während die Anzahl der Inklusionen über den Zeitverlauf nahezu konstant blieb, ließ sich 36 h p.i. eine starke Zunahme der EBs in Zellen und Überständen nachweisen. Dies könnte auf eine $\text{IFN}\gamma$ -bedingte Verzögerung des replikativen Entwicklungszyklus hindeuten. Doch trotz dieses Anstiegs nahm die Zahl der nachweisbaren rekultivierbaren EBs zu den späteren Zeitpunkten ab, was zum einen die persistente Infektion deutlich von der replikativen Infektion abgrenzte, und zum anderen die Möglichkeit der Reinfektion stark eingrenzte.

3.1.3 Persistente *Chlamydia psittaci* zeigen differentielle Genexpression

Für die molekulare Charakterisierung der $\text{IFN}\gamma$ -vermittelten Persistenz von *C. psittaci* wurde die differentielle Expression einiger chlamydialer Gene ermittelt, welche der Literatur entnommen wurden. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die untersuchten Gene, ihre Geneprodukte, deren Funktion und die übergeordnete Funktionsklasse.

Für die Analysen wurden replikative und persistente Infektionen in 6- well-Platten etabliert und zu den angegebenen Zeitpunkten wurden RNA-Proben gewonnen. Aus Parallelproben gewonnene genomische DNA diente zur Normalisierung der chlamydialen Transkription (siehe Formel 1).

Tabelle 9: zur Analyse ausgewählte chlamydiale Gene

Gen	Name des Genprodukts/ Proteins	Funktion	Funktions- klasse
<i>16S rRNA</i>		Initiation der Translation	Proteinbiosynthese
<i>rpoA</i>	DNA- directed RNA polymerase subunit alpha	Katalysation der Transkription	
<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A	negatives Supercoiling von dsDNA	Replikation
<i>ompA</i>	major outer membrane porin	Membranprotein, Adhäsion	Zellteilung
<i>ftsW</i>	cell division protein FtsW	Septenbildung bei der Zellteilung	
<i>amiB</i>	N- Acetylmuramoyl- L- Ala Amidase	Zellwand- Hydrolyse	
<i>pgk</i>	phosphoglycerate kinase	(De)Phosphorylierung während der Glykolyse	Metabolismus
<i>amn</i>	AMP nucleosidase	Regulierung intrazellulärer AMP- Level	
<i>glgP</i>	glycogen phosphorylase	Glykogenkatabolismus	
<i>cpaf</i>	chlamydia protease- like activity factor	sezernierte Protease	Pathogen- Wirt- Interaktion
<i>Tsp</i>	Tail- specific protease	sezernierte Protease	
<i>cHtrA</i>	chlamydial high temperature requirement protein A	sezernierte Protease, Chaperon- Aktivität	
<i>sctN</i>	type III secretion ATPase/ secretion and cellular translocation protein N	Energiebereitstellung für Typ- III- Sekretion	Stressantwort
<i>groEL</i>	60 kD chaperonin, Hsp60	Chaperon, Hitzeschockprotein	

Zusätzlich wurde in der genomischen DNA die relative Menge von *gyrA* gegenüber *GAPDH* bestimmt (siehe Formel 1), welche den Anteil chlamydialer DNA im Vergleich zu Wirtszell- DNA widerspiegelt.

Abbildung 5 zeigt die zeitabhängige Zunahme von chlamydialer DNA im Vergleich zu Wirtszell- DNA (*GAPDH*) in der replikativen Infektion, während ihr Anteil in der persistenten Infektion annähernd konstant blieb. Obwohl mit dieser Methode sowohl RBs als auch intrazelluläre EBs sowie aberrante, persistente Chlamydien erfasst wurden, spiegelte sich die Kinetik der Zunahme von Inklusionen und rekultivierbaren Chlamydien in der replikativen Infektion bzw. deren Konstanz in der persistenten Infektion wider und unterstützte auf molekularer Ebene die in Kapitel 3.1.2 vorgestellten Ergebnisse.

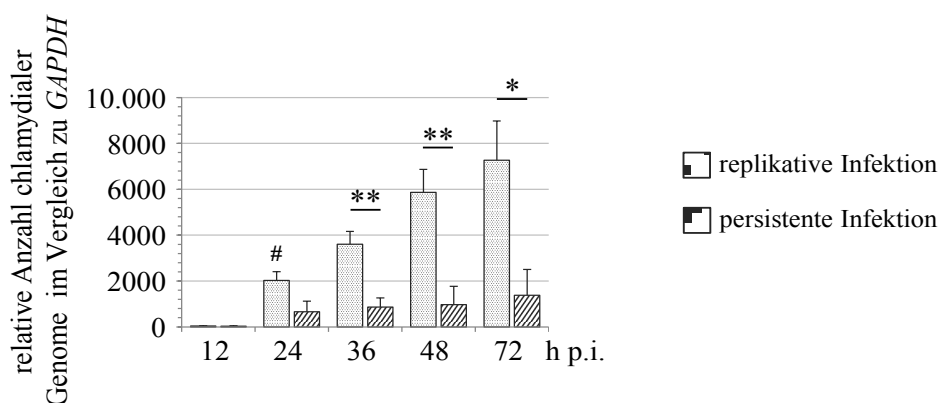


Abbildung 5: relative Anzahl chlamydialer Genome in replikativer und persistenter *C. psittaci*- Infektion; relative Anzahl *gyrA*- Kopien im Vergleich zu genomischer DNA der Wirtszellen (*GAPDH*) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (\pm SEM); $n = 4$; Rauten über den Säulen: signifikante Veränderung zum vorhergehenden Zeitpunkt der replikativen bzw. persistenten Infektion; Sterne: signifikante Unterschiede zwischen replikativer und persistenter Infektion; zweiseitiger Student's T-Test: #, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Tabelle 10 gibt die x- fache Expressionsänderung (siehe Formel 2) verschiedener chlamydialer Gene in der persistenten (Behandlung) gegenüber der replikativen (Kontrolle) *C. psittaci*- Infektion für verschiedene Zeitpunkte nach der Infektion an.

Tabelle 10: differentielle Transkription verschiedener chlamydialer Gene in der persistenten gegenüber der replikativen *C. psittaci*- Infektion in A549- Zellen; normalisiert gegen chlamydiale DNA; **rot: Hoch-**, **grün: Herunter**regulation um den Faktor ≥ 2 ; $n = 4$

Gen	x- fache Expressionsänderung (\pm SEM) in persistenter gegenüber replikativer <i>C. psittaci</i> - Infektion				
	12 h p.i.	24 h p.i.	36 h p.i.	48 h p.i.	72 h p.i.
<i>16S rRNA</i> (unpr.)	0,72 \pm 0,18	4,16 \pm 1,31	10,2 \pm 8,4	60,5 \pm 32,3	26,2 \pm 19,7
<i>16S rRNA</i> (proz.)	0,94 \pm 0,16	2,02 \pm 0,33	1,67 \pm 0,57	5,37 \pm 2,53	2,12 \pm 1,34
<i>rpoA</i>	0,82 \pm 0,11	2,59 \pm 0,26	3,39 \pm 2,29	2,49 \pm 1,37	1,39 \pm 0,97
<i>gyrA</i>	0,80 \pm 0,16	1,35 \pm 0,40	0,91 \pm 0,24	0,89 \pm 0,33	0,91 \pm 0,39
<i>ompA</i>	1,20 \pm 0,35	1,64 \pm 0,23	1,51 \pm 0,80	6,44 \pm 4,80	1,18 \pm 0,71
<i>ftsW</i>	0,79 \pm 0,18	1,60 \pm 0,44	0,71 \pm 0,16	0,98 \pm 0,36	0,69 \pm 0,36
<i>amiB</i>	0,48 \pm 0,19	1,05 \pm 0,14	0,79 \pm 0,23	1,16 \pm 0,53	0,72 \pm 0,30
<i>glgP</i>	0,84 \pm 0,21	0,83 \pm 0,33	0,75 \pm 0,25	0,69 \pm 0,28	0,59 \pm 0,43
<i>amn</i>	0,61 \pm 0,19	0,77 \pm 0,21	0,68 \pm 0,32	0,72 \pm 0,31	0,54 \pm 0,33
<i>pgk</i>	0,90 \pm 0,19	1,03 \pm 0,21	0,78 \pm 0,34	0,85 \pm 0,31	0,64 \pm 0,29
<i>cpaf</i>	0,85 \pm 0,33	1,01 \pm 0,16	0,75 \pm 0,18	1,54 \pm 0,71	0,98 \pm 0,29
<i>Tsp</i>	0,62 \pm 0,21	0,39 \pm 0,16	0,54 \pm 0,20	0,56 \pm 0,29	0,43 \pm 0,25
<i>cHtrA</i>	0,81 \pm 0,29	1,59 \pm 0,42	0,97 \pm 0,31	1,18 \pm 0,45	1,03 \pm 0,36
<i>sctN</i>	0,69 \pm 0,22	0,53 \pm 0,21	0,49 \pm 0,16	0,81 \pm 0,38	0,52 \pm 0,22
<i>groEL</i>	0,93 \pm 0,35	0,78 \pm 0,13	0,59 \pm 0,12	0,71 \pm 0,25	1,27 \pm 0,83

Auf den ersten Blick ist zu erkennen, dass sowohl die prozessierte als auch die unprozessierte Form der *16S rRNA* in der persistenten gegenüber der replikativen *C. psittaci*- Infektion moderat bis stark hochreguliert war. Auch das Gen für die RNA- Polymerase, *rpoA*, wurde hochreguliert. Während das Gen für das Membranprotein *ompA* in der Persistenz gegenüber der replikativen Infektion teilweise hochreguliert wurde, waren Gene, deren Produkte an der Pathogen- Wirt- Interaktion beteiligt sind, in der persistenten Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten herunterreguliert.

Die differentielle Transkription der ausgewählten chlamydialen Gene wird in den folgenden Kapiteln für die einzelnen funktionellen Großgruppen besprochen.

Gene für chlamydiale Transkription und Translation sind in der Persistenz hochreguliert

Die folgenden Diagramme geben die relative Expression der Transkripte gegenüber der chlamydialen DNA an (Formel 1), um auch zeitabhängige Expressionsunterschiede in replikativen und persistenten Infektionen darstellen zu können.

Die chlamydialen Gene *16S rRNA* und *rpoA*, welche mit der Proteinbiosynthese assoziiert sind, waren in der IFN γ - vermittelten Persistenz im Vergleich zur replikativen Infektion ab dem Zeitpunkt 24 h p.i. hochreguliert (Tab. 10 und Abb. 6). Während die unprozessierte und damit transiente Form der *16S rRNA* in der Persistenz zu späteren Zeitpunkten stark hochreguliert war, wurde ihre prozessierte und stabile Form gegenüber der replikativen Infektion nur leicht hochreguliert. Auch das Gen *rpoA*, dessen Produkt eine DNA-abhängige RNA- Polymerase darstellt, war in der persistenten gegenüber der replikativen Infektion moderat hochreguliert.

Betrachtet man die relative Expression der unprozessierten Form der *16S rRNA* im Zeitverlauf (Abb. 6.A), so zeigte sich zunächst eine signifikante Reduktion der Transkriptmenge je bakteriellem Genom zwischen den Zeitpunkten 12 und 24 h p.i. ($p < 0,05$). Während ihre Anzahl in der persistenten Infektion zu späteren Zeitpunkten wieder zunahm, wurde in der replikativen Infektion nicht mehr das Niveau von 12 h p.i. erreicht. Ein vergleichbares Bild ergab sich für die prozessierte Form der *16S rRNA* (Abb. 6.B). Von dieser stabileren Form der *16S rRNA* lag jedoch die bis zu 10^6 - fache Anzahl der Transkripte als von der unprozessierten Form vor, was deren Transienz unterstreicht. Die zeitabhängige differentielle Expression der *16S rRNA* zeigt wiederum, dass dieses Gen zur Normalisierung der Transkription anderer Gene wenig geeignet ist.

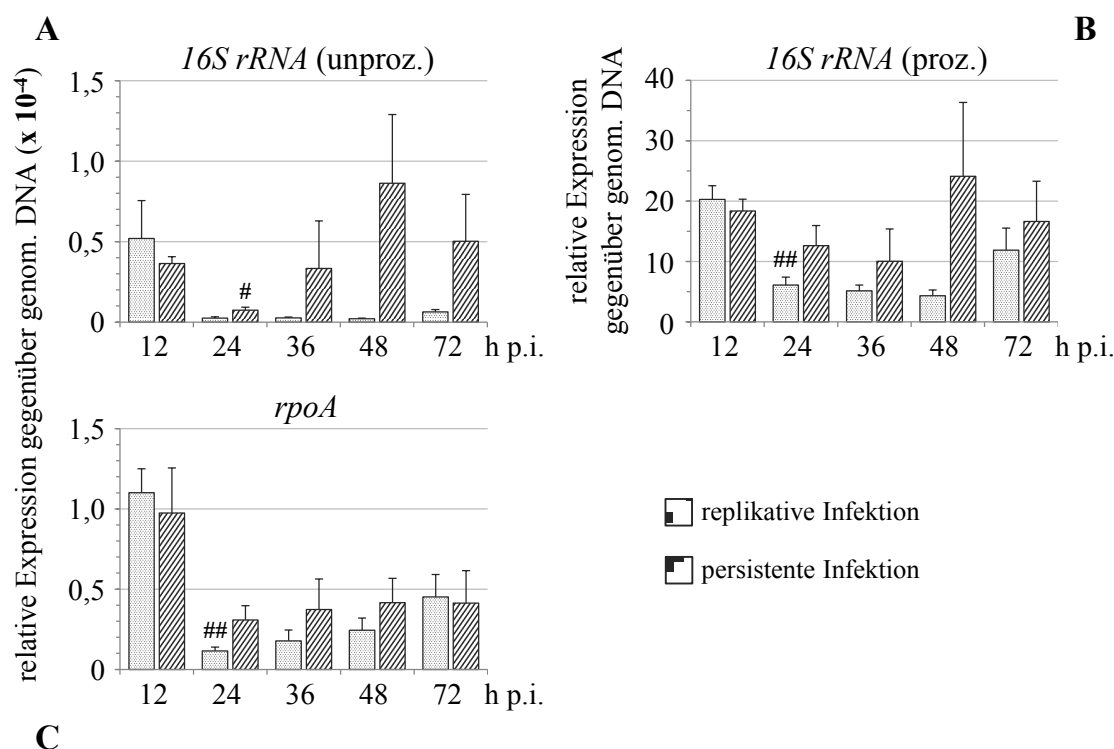


Abbildung 6: relative Expression von *16S rRNA* (A & B) und *rpoA* (C) in der replikativen und persistenten *C. psittaci*- Infektion; \pm SEM; Normalisierung gegenüber chlamydialer genomischer DNA; $n = 4$; Rauten über den Säulen: signifikante Veränderung zum vorhergehenden Zeitpunkt der replikativen bzw. persistenten Infektion; zweiseitiger Student's T-Test: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$

Auch die relative Expression von *rpoA* gegenüber chlamydialer DNA (Abb. 6.C) zeigte ein ähnliches Muster im Zeitverlauf wie beide Formen der *16S rRNA*. So nahm die Transkriptmenge zwischen 12 und 24 h p.i. zunächst signifikant ab ($p < 0,01$), um anschließend wieder leicht anzusteigen. Jedoch wurde auch hier sowohl in persistenter als auch replikativer Infektion nicht mehr das Niveau von 12 h p.i. erreicht.

Die Reduktion der Transkriptmengen dieser für Transkription und Translation relevanten Gene in der replikativen Infektion könnte an der zunehmenden Menge EBs innerhalb der Proben liegen, welche inaktiv sind und diese Prozesse nicht durchführen.

Replikation- und Zellteilung- assoziierte Gene sind nicht differentiell reguliert

Wie aus Tabelle 10 hervorgeht, wurden diese Gene in der persistenten gegenüber der replikativen *C. psittaci*- Infektion nicht differentiell reguliert. Lediglich *ompA* war zum Zeitpunkt 48 h p.i. nicht signifikant heraufreguliert.

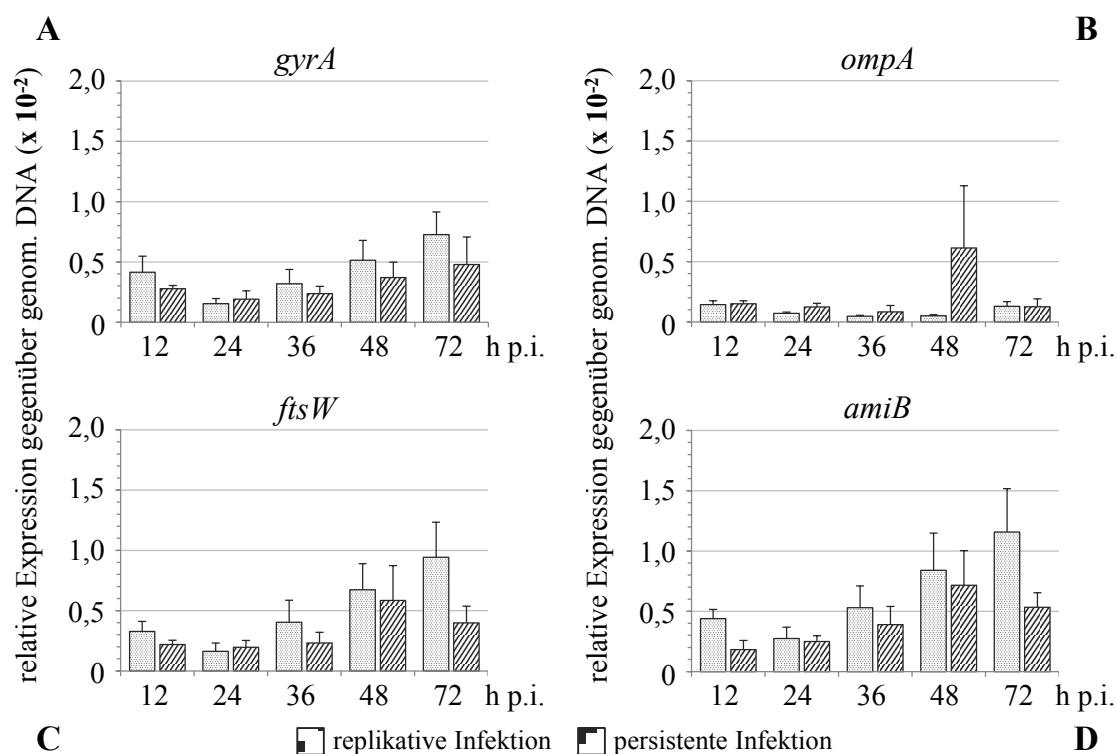


Abbildung 7: relative Expression von *gyrA* (A), *ompA* (B), *ftsW* (C) und *amiB* (D) in der replikativen und persistenten *C. psittaci*- Infektion; \pm SEM; Normalisierung gegenüber chlamydialer genomischer DNA; n = 4; zweiseitiger Student's T-Test

Die Analyse der relativen Expression der Replikation- und Zellteilung- assoziierten Gene zeigte, dass zwischen 12 und 24 h p.i. eine Verringerung der Transkription der untersuchten Gene erfolgte, was mit dem Ende der replikativen Phase des Entwicklungszyklus zusammenfiel (Abb. 7). Ab dem Zeitpunkt 36 h p.i. stieg die Anzahl der Transkripte von *gyrA*, *ftsW* und *amiB* je chlamydialem Genomäquivalent kontinuierlich an, bis 72 h p.i. der Höhepunkt erreicht wurde. Dabei zeigten persistente Chlamydien ein ähnliches Muster wie replikative, jedoch war die Transkriptmenge je Genomäquivalent etwas geringer. Die *ompA*- Transkripte erreichten ihren niedrigsten Wert 36 h p.i. (Abb. 7.B). 48 h p.i. wiesen persistente Chlamydien eine sehr hohe relative Expression von *ompA* auf, welche jedoch nicht signifikant war.

Metabolismus- assoziierte Gene sind nicht signifikant differentiell reguliert

Die untersuchten Gene *pgk*, *amn* und *glgP*, deren Genprodukte mit dem Glucose- bzw. Aminosäure- Metabolismus assoziiert sind, zeigten tendenziell eine Herunterregulierung in der persistenten gegenüber der replikativen Infektion (Tab. 10).

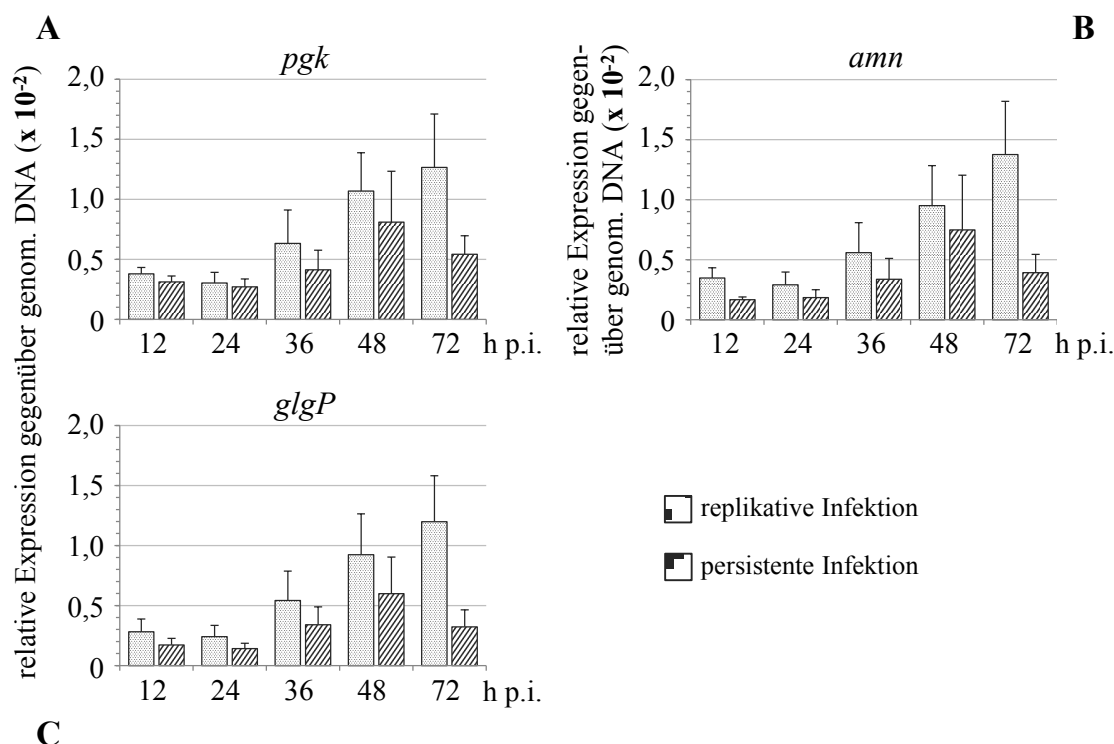


Abbildung 8: relative Expression von *pgk* (A), *amn* (B) und *glgP* (C) in der replikativen und persistenten *C. psittaci*- Infektion; \pm SEM; Normalisierung gegenüber chlamydialer genomischer DNA; n = 4; zweiseitiger Student's T-Test

Auch hier spiegelte sich die zeitabhängige Veränderung der Transkriptmenge, welche bereits oben beschrieben wurde, wider (Abb. 8). Die Anzahl der relativen Transkripte gegenüber den chlamydialen Genomäquivalenten blieb zu den Zeitpunkten 12 und 24 h p.i. auf nahezu einem Niveau und stieg im weiteren Verlauf der replikativen bzw. persistenten Infektion an. Dieser Anstieg fiel für die replikativen Chlamydien stärker aus, was vor allem zu den späteren Zeitpunkten eine leichte, jedoch nicht signifikante Herunterregulierung der untersuchten Gene in der persistenten gegenüber der replikativen Infektion verursachte. Durch diese Reduktion der Transkription Metabolismus- assoziierter Gene in der persistenten Infektion wird ein verringerter Metabolismus impliziert.

Gene der Pathogen- Wirtszell- Interaktion sind in der persistenten Infektion leicht herunterreguliert

Wie Tabelle 10 zu entnehmen ist, waren die untersuchten Gene, welche an der Pathogen- Wirtszell- Interaktion beteiligt sind, in der persistenten gegenüber der replikativen Infektion tendenziell herunterreguliert.

Die relative Expression der Gene für die Proteasen *cpaf* (Abb. 9.A) und *cHtrA* (Abb. 9.C) nahm zwischen 12 und 24 h p.i. ab, um im weiteren Verlauf der Infektion wieder anzusteigen. Für diese beiden Gene waren keine Unterschiede zwischen replikativen und persistenten Chlamydien zu detektieren.

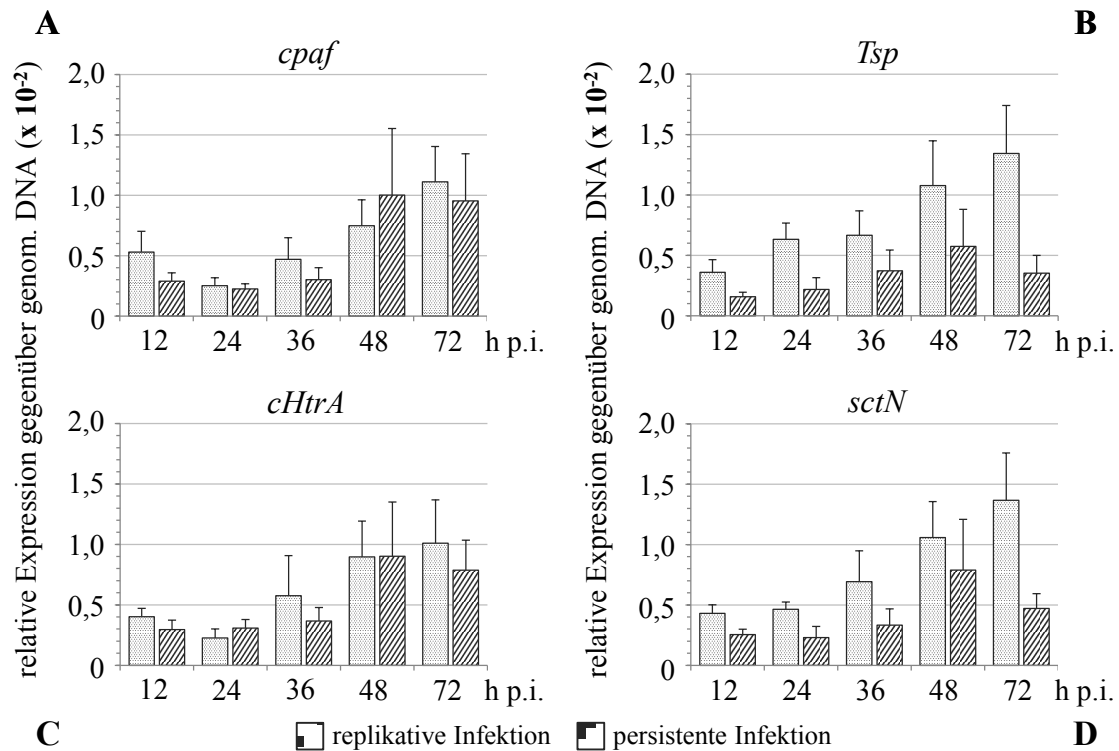


Abbildung 9: relative Expression von *cpaf* (A), *Tsp* (B), *cHtrA* (C) und *sctN* (D) in der replikativen und persistenten *C. psittaci*- Infektion; \pm SEM; Normalisierung gegenüber chlamydialer genomischer DNA; n = 4; zweiseitiger Student's T-Test

Dahingegen stieg die Anzahl der Transkripte der Protease *Tsp* (Abb. 9.B) und von *sctN*, dessen Genprodukt zur Energiebereitstellung für das TTSS dient (Abb. 9.D), in der replikativen Infektion kontinuierlich an. In der persistenten Infektion nahm die Zahl der Transkripte weniger stark zu und verringerte sich zum Zeitpunkt 72 h p.i. wieder. Dadurch ergab sich, vor allem zu den späteren Zeitpunkten, eine tendenzielle, nicht- signifikante Herunterregulierung der genannten Gene in der persistenten *C. psittaci*- Infektion, was auf eine Verringerung der Sekretion chlamydialer Effektorproteine in die Wirtszelle in der persistenten Infektion hindeuten könnte.

Das Stressantwort- Gen *groEL* ist nicht differentiell reguliert

Das Gen für das Hitzeschockprotein Hsp60, *groEL*, war in der persistenten gegenüber der replikativen *C. psittaci*- Infektion nicht differentiell reguliert (Tab. 10).

Jedoch ließ sich auch hier eine zeitabhängige Zu- bzw. Abnahme der Transkriptmengen in der jeweiligen Infektion nachweisen (Abb. 10), wobei die relative Expression zu den Zeitpunkten 12 und 72 h p.i. sowohl in der replikativen als auch in der persistenten Infektion am höchsten war.

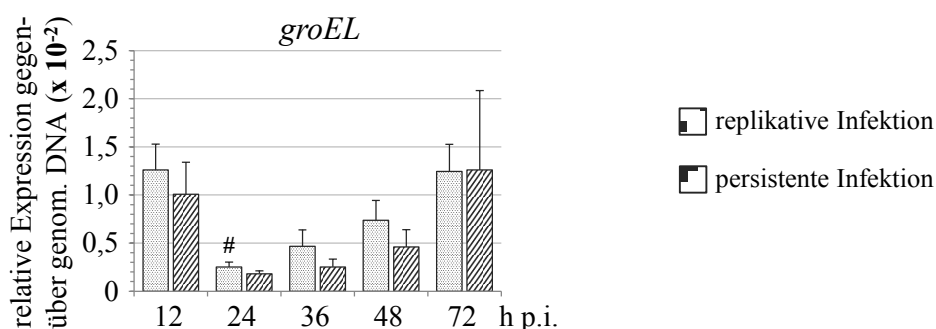


Abbildung 10: relative Expression von *groEL* in der replikativen und persistenten *C. psittaci*-Infektion; \pm SEM; Normalisierung gegenüber chlamydialer genomischer DNA; $n = 4$; Rauten über den Säulen: signifikante Veränderung zum vorhergehenden Zeitpunkt der replikativen bzw. persistenten Infektion; zweiseitiger Student's T-Test: # $p < 0,05$

3.2 Sensitivität replikativer und persistenter *C. psittaci* gegenüber Antibiotika

3.2.1 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration gegenüber replikativen *C. psittaci*

Die Minimale Hemmkonzentration (**m**inimal **i**nhibitory **c**oncentration, MIC) wird als die niedrigste Antibiotikakonzentration definiert, welche benötigt wird, um die Bildung chlamydialer Inklusionen zu verhindern. Ihre Bestimmung erfolgte in modifizierter Form nach Dreses- Werringloer und Kollegen (DRESES-WERRINGLOER *et al.* 2000).

Nach Infektion der A549- Zellen mit MOI 1 wurde das Inokulum entfernt und durch Medium mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Antibiotikums (beginnend bei 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 5- fach Verdünnungsschritten bis 0,00064 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ersetzt. Die Detektion chlamydialer Inklusionen erfolgte nach 24- stündiger Inkubation mittels Epifluoreszenzmikroskopie.

Mit steigender Antibiotika- Konzentration konnte eine Verringerung der Größe der chlamydialen Inklusionen nachgewiesen werden, wobei diese aber weiterhin deutlich erkennbar waren. Als MIC wurde die Konzentration festgesetzt, bei der keine Inklusionen mehr nachgewiesen werden konnten. Diese Werte sind in Tabelle 11 für einige Vertreter verschiedener Wirkstoffgruppen angegeben.

Tabelle 11: Minimale Hemmkonzentrationen von Antibiotika (MIC)

Antibiotikum	Wirkstoffgruppe	MIC [$\mu\text{g/ ml}$]
Doxycyclin	Tetrazykline	0,08
Erythromycin	Makrolide	0,016
Roxithromycin		0,016
Ofloxacin	(Fluor) Chinolone	2
Levofloxacin		2
Enrofloxacin		2
Rifampicin	Rifamycine	0,016

Die effektivsten Antibiotika waren die Makrolide Erythromycin und Roxithromycin sowie das zur Gruppe der Rifamycine gehörende Rifampicin mit einer MIC von jeweils 0,016 $\mu\text{g/ ml}$. Eine ähnlich niedrige MIC mit 0,08 $\mu\text{g/ ml}$ wies das Tetrazyklin Doxycyclin auf. Die Chinolone Ofloxacin, Levofloxacin und Enrofloxacin hingegen wiesen mit 2 $\mu\text{g/ ml}$ eine um das mehr als 100- fache höhere MIC auf.

3.2.2 Replikative *C. psittaci* werden durch Antibiotika bei frühzeitiger Zugabe zur Infektion effektiv inhibiert

Für weitergehende Analysen der Empfindlichkeiten von *C. psittaci* wurden die Antibiotika erster Wahl bei Chlamydieninfektionen, Doxycyclin, Erythromycin und Levofloxacin angewendet. Als alternative Behandlungsstrategie wurde deren jeweilige Kombination mit Rifampicin untersucht. Rifampicin wurde als Kontrolle ebenfalls mitgeführt. Es wird *in vivo* aufgrund der schnellen Resistenzentwicklung jedoch nur in Kombination mit anderen Antibiotika verabreicht.

Die Antibiotika wurden zum einen mit ihrer MIC und zum anderen mit der zehnfachen MIC eingesetzt. Diese höhere Konzentration wurde gewählt, um auch mit Doxycyclin und Erythromycin einen bakteriziden Wirkungsbereich abzudecken, der gegenüber der MIC um das vier- bis acht- fache erhöht ist (DONATI *et al.* 1998). Die zehnfachen MICs liegen in einem Konzentrationsbereich, der auch *in vivo* erreicht werden kann.

Das Design der Zellkulturassays orientierte sich an der Publikation von Reveneau und Kollegen aus dem Jahr 2005 (REVENEAU *et al.* 2005) und wurde im 96- well- Format durchgeführt. Die Zugabe der Antibiotika erfolgte 12 oder 48 h p.i. (Abb. 11).

Die Zugabe der Antibiotika während des ersten Replikationszyklus (12 h p.i.) sollte eine frühzeitige antibiotische Behandlung einer Chlamydieninfektion simulieren. Hierbei ist da-

von auszugehen, dass sich alle RBs in einem annähernd synchronen Entwicklungszustand befinden und somit in gleichem Maße auf eine antibiotische Behandlung ansprechen. Der spätere Zeitpunkt 48 h p.i. entsprach einer etablierten Infektion, welche sich durch eine heterogene Zusammensetzung von RBs und EBs auszeichnet (vgl. Kapitel 3.1.2).

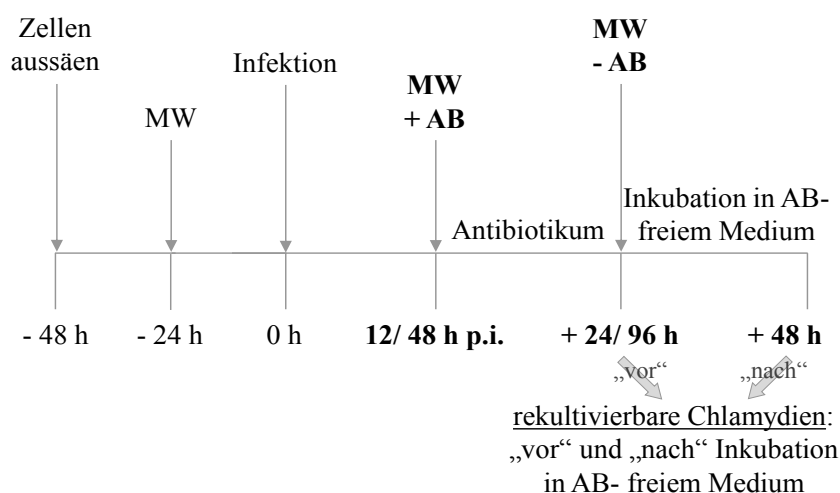


Abbildung 11: Zellkulturassays zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeiten replikativer *Chlamydia psittaci*; schematische Darstellung modifiziert nach (REVENEAU *et al.* 2005); genaue Beschreibung des Versuchsaufbaus im Text; MW = Mediumwechsel, AB = Antibiotikum/ Antibiotika

Es folgte eine kurze (24 h) oder lange (96 h) Inkubation mit Antibiotika. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden die verbliebenen rekultivierbaren intrazellulären EBs durch Titration auf BGM- Zellen erfasst („vor Inkubation in AB- freiem Medium“). Um bakteriostatische Effekte der Antibiotika zu identifizieren, wurde das Antibiotika- haltige Medium nach Ablauf der Inkubationsdauer entzogen und durch frisches, Antibiotika- freies Medium ersetzt. Eine 48- stündige Inkubation schloss sich an, um es inhibierten Chlamydien zu ermöglichen, Wachstum, Replikation und Differenzierung zu EBs aufzunehmen („nach Inkubation in AB- freiem Medium“).

Zu jedem in Abbildung 11 fett markierten Zeitpunkt wurde eine Antibiotika- unbehandelte Kontrolle mitgeführt, wobei analog zu den behandelten Proben ein entsprechender Medienwechsel ohne Antibiotikum durchgeführt wurde.

Anhand dieser Kontrollen konnte die Kinetik der Zu- und Abnahme von rekultivierbaren EBs in der replikativen *C. psittaci*- Infektion zu den in den Abbildungen 11 und 12 markierten Zeitpunkten dargestellt werden.

12 h p.i. konnten 5000 EBs je well angezüchtet werden (Abb. 12.A und B). Eine weitere Inkubationsdauer von 24 bzw. 96 h führte zu einer Zunahme auf ca. $5,3 \times 10^7$ bzw.

$1,2 \times 10^8$ EBs/ well ($p < 0,01$). Der erneute Medienwechsel und anschließend weitere 48 Stunden Inkubation hatten eine Verdoppelung der Zahl auf $1,2 \times 10^8$ bzw. 2×10^8 rekultivierbare EBs je well zur Folge ($p < 0,01$ bzw. $0,05$).

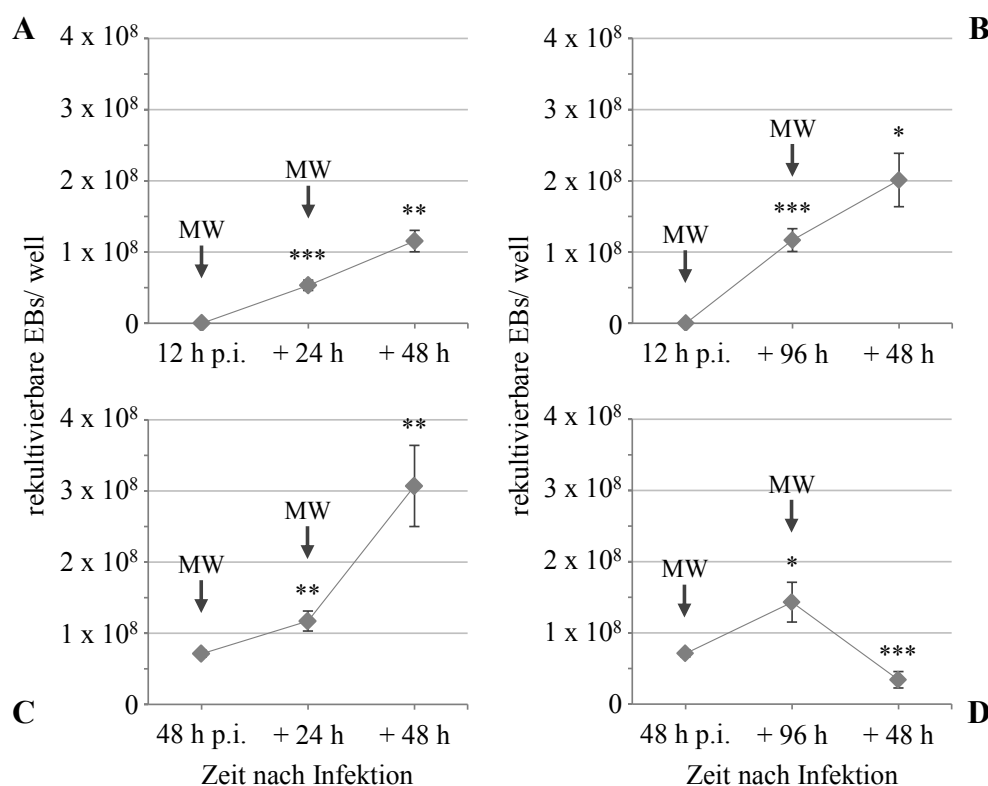


Abbildung 12: Rekultivierbarkeit replikativer *C. psittaci* zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion und (mehrmaligem) Mediumwechsel; \pm SEM; Rekultivierung nach A: 12, 36 und 84 h; B: 12, 108 und 156 h; C: 48, 72 und 120 h; D: 48, 144 und 192 h; MW: zu dem angegebenen Zeitpunkt erfolgte ein Austausch des Mediums; Sterne: signifikante Änderung der Anzahl der rekultivierbaren EBs im Vergleich zum vorhergehenden Zeitpunkt; zweiseitiger Student's T-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$**

Zum Zeitpunkt 48 h p.i. konnten bereits ca. 7×10^7 EBs/ well nachgewiesen werden (Abb. 12 C und D). Ihre Zahl erhöhte sich nach 24- bzw. 96- stündiger Inkubation nur um das bis zu Zweifache auf ca. $1,2 - 1,4 \times 10^8$ rekultivierbare EBs/ well ($p < 0,01$ bzw. $0,05$). Der Medienwechsel nach 24- stündiger Inkubationsdauer und anschließende 48 h Inkubationsdauer hatten eine weitere signifikante Zunahme der rekultivierbaren EBs auf ca. $3,1 \times 10^8$ EBs/ well ($p < 0,01$) zur Folge (Abb. 12.C). Wurde das Medium nach 96- stündiger Inkubation getauscht und eine 48- stündige Inkubation angeschlossen, sank die Zahl der rekultivierbaren EBs auf ca. ein Viertel gegenüber dem vorhergehenden Zeitpunkt ($p < 0,001$; Abb. 12.D). Dieser Effekt der Selbstlimitation wurde bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben und wird durch wiederholte Reinfektionen und die stetige Abnahme nicht- in-

fizierter Zellen begründet. Des Weiteren gilt es, diesen Aspekt bei der Auswertung der nachfolgenden Zellkulturassays zu berücksichtigen.

Die frühzeitige Antibiotikagabe verursacht eine wirksame Inhibierung replikativer *C. psittaci*

Die Anzahl rekultivierbarer EBs nach Antibiotikabehandlung replikativer *C. psittaci* zum Zeitpunkt 12 h p.i. und mit verschiedenen Inkubationszeiten sind in Abbildung 13 wiedergegeben.

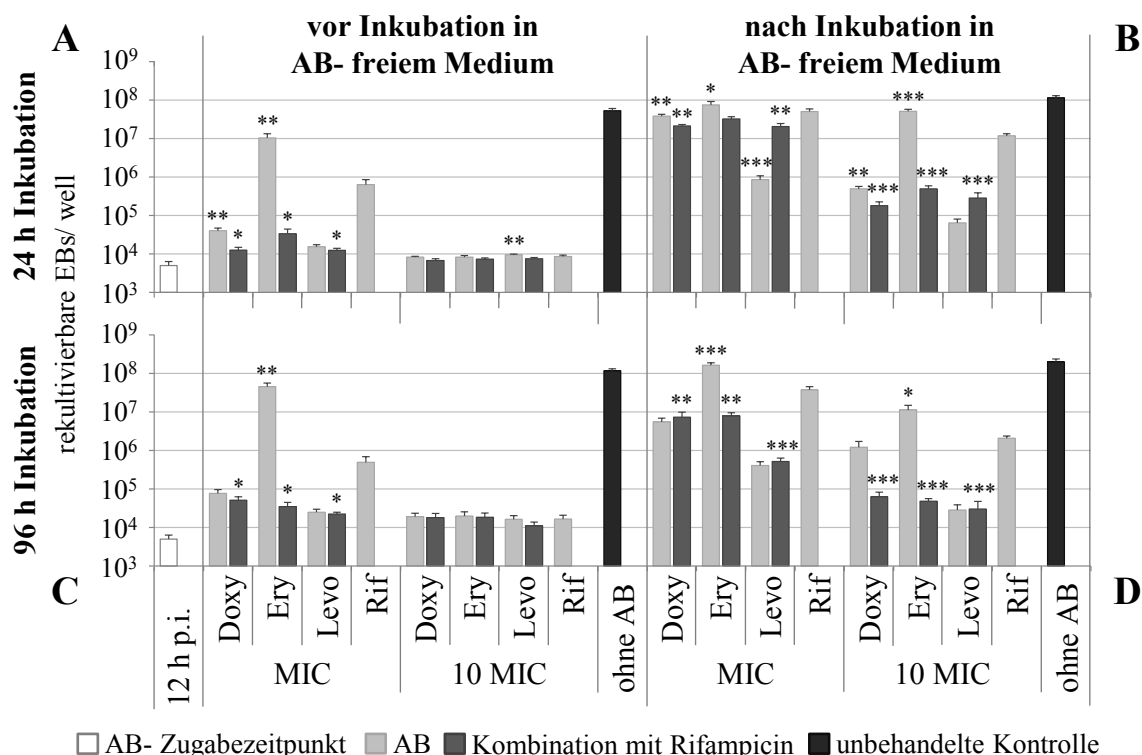


Abbildung 13: Reduktion der Anzahl rekultivierbarer Chlamydien nach Antibiotikabehandlung einer replikativen Infektion bei Zugabe der Antibiotika 12 h p.i.; 24- (A & B) bzw. 96- stündige (C & D) Inkubation, vor (A & C) und nach (B & D) 48- stündiger Inkubation in AB-freiem Medium; Sterne über den hellgrauen Säulen: Signifikanz zwischen Einzelbehandlung mit dem jeweiligen AB und seiner Kombination mit Rif, Sterne über den dunkelgrauen Säulen: Signifikanz zwischen Kombinations- Behandlung und Rif- Einzelbehandlung; n = 12; zweiseitiger Student's T- Test: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; AB = Antibiotikum, MIC = minimale Hemmkonzentration, Doxy = Doxycyclin, Ery = Erythromycin, Levo = Levofloxacin, Rif = Rifampicin

So ließ sich die Anzahl rekultivierbarer *C. psittaci* durch die Behandlung mit verschiedenen Antibiotika und ihren Kombinationen mit Rifampicin (MIC und 10 MIC) signifikant um mehr als drei \log_{10} -Stufen (p < 0,001) gegenüber der unbehandelten Kontrolle reduzieren, wenn die EBs direkt nach Inkubation mit den Antibiotika rekultiviert wurden

(Abb. 13.A und C und Tabelle 19 im Anhang, Kapitel 11.3). Eine Ausnahme bildeten hierbei Erythromycin und Rifampicin, deren Wirksamkeit durch Erhöhung der eingesetzten Konzentration auf die zehnfache MIC verbessert werden konnte. Auch ihre Kombination wies bei einfacher MIC eine signifikant bessere Effizienz gegenüber den jeweils einzeln eingesetzten Antibiotika auf.

Die Anwendung der zehnfachen MIC zeigte für keines der eingesetzten Antibiotika eine signifikant bessere Effizienz bei der Reduktion der wiederanzüchtbaren EBs im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um einen bakterio-statischen Effekt handelt oder um eine, sich unter Antibiotikadruck entwickelnde Persistenz, wurde das Antibiotika- haltige Medium ausgetauscht und durch Antibiotika- freies Medium ersetzt. Nach einer 48- stündigen Inkubation erfolgte die Evaluation der rekultivierbaren EBs (Abb. 13.B und D und Tabelle 19).

Dadurch wurde die bakterio-statische Wirkung der einfachen MIC deutlich. Bei 24- stündiger Inkubationsdauer in Antibiotika- haltigem Medium wurde eine Reduktion von weniger als einer \log_{10} - Stufe gegenüber der unbehandelten Kontrolle erzielt (Abb. 13.B). Eine höhere Effizienz zeigte lediglich die Levofloxacin- Behandlung, welche zu einer signifikanten Reduktion der EBs um mehr als zwei \log_{10} - Stufen gegenüber der Kontrolle führte ($p < 0,001$). Auch die Verlängerung der Inkubationsdauer auf 96 h und anschließende Inkubation in Antibiotika- freiem Medium führte zu einer Verringerung der rekultivierbaren EBs um mehr als eine \log_{10} - Stufe gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 13.D). Hier bildeten Erythromycin und Rifampicin mit einer geringeren Wirksamkeit ebenfalls die Ausnahme.

Dahingegen konnte die erhöhte Wirksamkeit der zehnfachen MIC auch nach Inkubation in Antibiotika- freiem Medium bestätigt werden. Hier wurde die Anzahl der rekultivierbaren Chlamydien um mehr als zwei (nach 24- stündiger Inkubation mit Antibiotika) oder drei \log_{10} - Stufen (96 h Inkubation) gegenüber der unbehandelten Kontrolle verringert. Erythromycin und teilweise auch Doxycyclin waren signifikant weniger effizient als ihre Kombination mit Rifampicin. Bemerkenswert ist zudem, dass die Kombination von Levofloxacin und Rifampicin nach 24- stündiger Inkubation weniger effektiv war als Levofloxacin allein (Abb. 13.B).

Somit zeigte sich, dass Erythromycin und Rifampicin, aber u.U. auch Doxycyclin, sowohl in einfacher als auch zehnfacher MIC weniger wirksam bei der Reduktion rekultivierbarer *C. psittaci* sind als Levofloxacin oder ihre Kombination mit Rifampicin. Des Weiteren

wirkt vor allem die einfache MIC bakteriostatisch, was durch Entzug der Antibiotika und anschließende Inkubation in Antibiotika- freiem Medium gezeigt wurde.

Die Wirksamkeit der Antibiotika gegenüber replikativen *C. psittaci* sinkt bei Zugabe zu einem späten Zeitpunkt während des Replikationszyklus

Die Zugabe der Antibiotika 48 h nach Infektion führte unabhängig vom angewendeten Antibiotikum zu einer Reduktion der wiederanzüchtbaren Chlamydien gegenüber der Antibiotika- unbehandelten Kontrolle um weniger als eine \log_{10} - Stufe ($p < 0,001$), wenn die Anzahl der EBs direkt nach Inkubation in Antibiotika- haltigem Medium bestimmt wurde (Abb. 14.A und Tabelle 20 im Anhang, Kapitel 11.3).

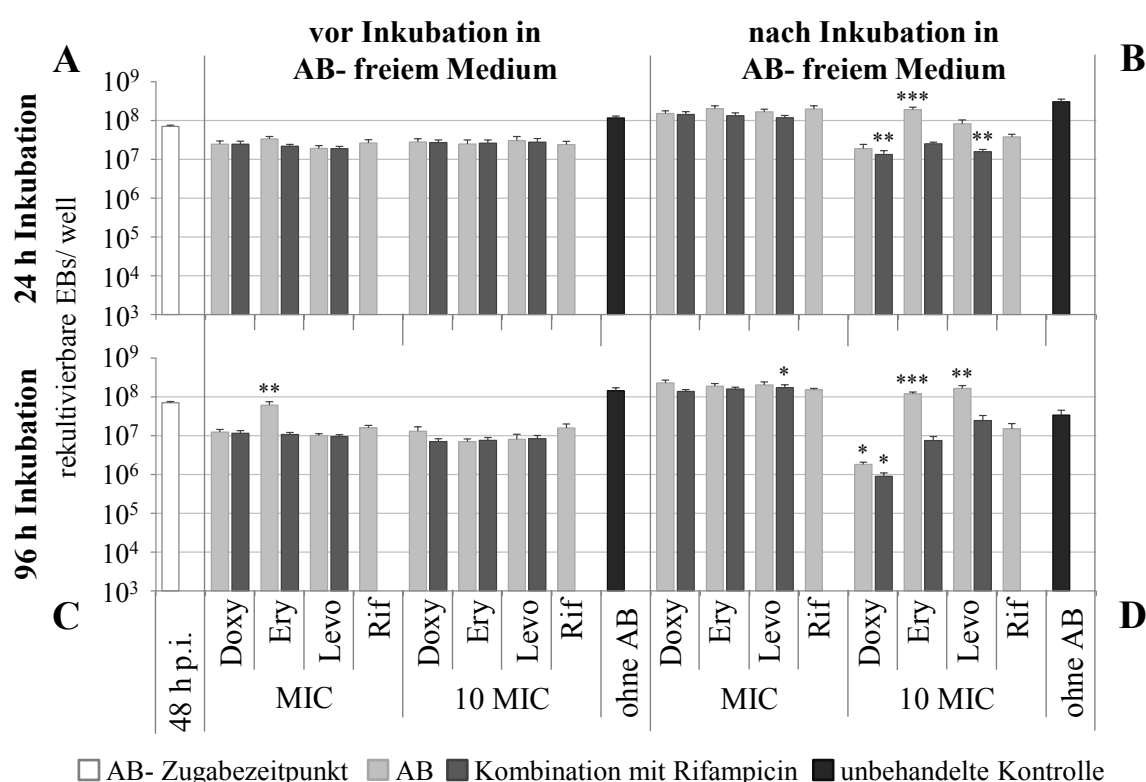


Abbildung 14: Reduktion der Anzahl rekultivierbarer Chlamydien nach Antibiotikabehandlung einer replikativen Infektion bei Zugabe der Antibiotika 48 h p.i.; 24- (A & B) bzw. 96- stündige (C & D) Inkubation, vor (A & C) und nach (B & D) 48- stündiger Inkubation in AB-freiem Medium; Sterne über den hellgrauen Säulen: Signifikanz zwischen Einzelbehandlung mit dem jeweiligen AB und seiner Kombination mit Rif, Sterne über den dunkelgrauen Säulen: Signifikanz zwischen Kombinations- Behandlung und Rif- Einzelbehandlung; $n = 12$; zweiseitiger Student's T- Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; AB = Antibiotikum, MIC = minimale Hemmkonzentration, Doxy = Doxycyclin, Ery = Erythromycin, Levo = Levofloxacin, Rif = Rifampicin

Die Effizienz der Antibiotika ließ sich durch Verlängerung der Inkubationsdauer etwas steigern (mehr als eine \log_{10} -Stufe) (Abb. 14.C und Tabelle 20), jedoch nicht durch Einsetzen einer höheren Konzentration (10 MIC). Lediglich Erythromycin bildete eine Ausnahme, da die Wirksamkeit seiner einfachen MIC durch Verlängerung der Inkubationsdauer verringert wurde. Die Anwendung der zehnfachen MIC bzw. der Kombination mit Rifampicin führte jedoch zu einer Verbesserung der Effizienz von Erythromycin.

Der Entzug der Antibiotika und eine 48- stündige Inkubation in Antibiotika- freiem Medium führte zu einem Anstieg der Anzahl rekultivierbarer EBs um bis zu eine \log_{10} - Stufe in Kulturen, welche mit der einfachen MIC behandelt wurden (Abb. 14.B und D und Tabelle 20). Dieser Anstieg war in den Kulturen, welche 96 h mit Antibiotika in einfacher MIC behandelt wurden, stärker ausgeprägt. Auch hier gab es, unabhängig von der Länge der Inkubationsdauer, keine Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsstrategien, was auf einen deutlichen bakteriostatischen Effekt aller Antibiotika hinwies, wenn sie in einfacher MIC angewendet wurden. Bemerkenswert ist zudem, dass die Zahl wiederanzüchtbarer EBs nach Behandlung mit der einfachen MIC teilweise die Anzahl in der unbehandelten Kontrolle überstieg (Abb. 14.D). Dieser Effekt ist der Selbstlimitation der replikativen, unbehandelten Infektion zuzuschreiben.

Die Anwendung der zehnfachen MIC führte zu einer Verringerung der rekultivierbaren EBs um bis zu mehr als eine \log_{10} - Stufe im Vergleich zur Antibiotika- unbehandelten Kontrolle (Abb. 14.B und D). Vor allem Doxycyclin und seine Kombination mit Rifampicin wiesen eine gute Wirksamkeit gegen replikative *C. psittaci* auf. Dagegen waren Erythromycin, Levofloxacin und Rifampicin weniger effektiv. Teilweise ließ sich eine höhere Anzahl EBs nach Erythromycin- bzw. Levofloxacin- Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle rekultivieren, was wiederum auf die Selbstlimitation der unbehandelten *C. psittaci*- Infektion (siehe oben) zurückzuführen ist (Abb. 14.D). Interessant ist hier vor allem die mangelnde Wirksamkeit von Levofloxacin, welches nach Aufhebung möglicher bakteriostatischer Effekte und bei Anwendung der zehnfachen MIC weniger effektiv ist als Erythromycin und dessen Wirksamkeit durch Rifampicin zwar gesteigert werden konnte, aber hinter der der Rifampicin- Kontrolle zurückblieb. Dies könnte auf eine mögliche Selektion Chinolon- resistenter Chlamydien hindeuten.

3.2.3 Die Antibiotika zeigen eine eingeschränkte Wirksamkeit gegenüber persistenten *C. psittaci*

Die Wirksamkeit von Doxycyclin, Erythromycin, Levofloxacin und deren Kombinationen mit Rifampicin gegenüber persistenten *C. psittaci* wurde analog zu dem in Kapitel 3.2.2 vorgestellten Schema bestimmt (Abbildung 11). Zu den Zeitpunkten -24 h, 0 h und 12/48 h p.i. wurde das Medium mit jeweils 200 U IFN γ /ml versetzt um persistente *C. psittaci*- Infektionen zu etablieren (siehe Kapitel 3.1.1). Nach 24- bzw. 96- stündiger Inkubationsdauer erfolgte der Entzug von Antibiotikum und IFN γ und das Medium wurde durch frisches, Antibiotika- und IFN γ - freies Medium ersetzt. Die anschließende 48- stündige Inkubation in diesem Medium diente zur Reaktivierung persistenter Chlamydien. Daher wird die 48- stündige Inkubation in Antibiotika- und IFN γ - freiem Medium im Folgenden als „mit Reaktivierung“ und die Bestimmung der rekultivierbaren EBs direkt nach Antibiotikabehandlung als „ohne Reaktivierung“ bezeichnet. Anhand der Reaktivierung konnte gezeigt werden, dass die IFN γ - vermittelte Persistenz von *C. psittaci* reversibel ist, die Chlamydien durch Entzug des Persistenzstimulus also wieder in das replikative Stadium übergehen. Dies ist ein wichtiges Merkmal der chlamydialen Persistenz (Kapitel 1.1). Abbildung 15 gibt die Zahlen der rekultivierbaren EBs nach verschiedenen Zeitpunkten in der Infektion und nach Reaktivierung wieder. Diese Diagramme sind analog zu den Diagrammen in Abbildung 12, welche die rekultivierbaren EBs in der replikativen Infektion zeigen und besitzen zur besseren Gegenüberstellung die gleiche y- Achseneinteilung. Dadurch lassen sich Zu- und Abnahmen in der persistenten Infektion weniger gut optisch darstellen.

Zum Zeitpunkt 12 h p.i. ließen sich ca. 1×10^4 EBs je well rekultivieren (Abb. 15.A und B). Nach weiteren 24 h Infektionsdauer erhöhte sich ihre Anzahl auf $4,4 \times 10^6$ EBs/ well und nahm nach 48- stündiger Reaktivierung auf $3,4 \times 10^6$ EBs/ well ab, was durch eine zeitverzögerte Wirkung des IFN γ und nachfolgend der Aktivität der IDO begründet werden könnte (Abb. 15.A). Dafür spricht auch, dass die Ausdehnung der Inkubationsdauer auf 96 h zu einem weniger starken Anstieg gegenüber dem Zeitpunkt 12 h p.i. auf $1,9 \times 10^6$ EBs je well führte. Nach Reaktivierung erfolgte jedoch ein starker Anstieg auf $2,6 \times 10^7$ rekultivierbare EBs je well (Abb. 15.B).

Auch 48 h p.i. ließen sich zwar mit ca. 5×10^5 IFUs mehr rekultivierbare Chlamydien nachweisen als 12 h p.i., jedoch war ihre Zahl gegenüber der replikativen Infektion um das mehr als 100- fache reduziert (Abb. 15.C und D). Nach weiteren 24 oder 96 h Inkubation

blieb die Zahl der rekultivierbaren EBs konstant oder nahm um ca. eine \log_{10} - Stufe ab ($7,6 \times 10^5$ bzw. $7,6 \times 10^4$ EBs well). Dies unterstreicht wiederum die langanhaltende Wirkung des $\text{IFN}\gamma$. Die nachfolgende Reaktivierung durch Entzug des $\text{IFN}\gamma$ resultierte nach vorangegangener 24- stündiger Inkubation in einer leichten Abnahme der Zahl rekultivierbarer EBs ($5,4 \times 10^5$ EBs/ well; Abb. 15.C), während nach vorheriger 96- stündiger Inkubation eine signifikante Zunahme um mehr als zwei \log_{10} - Stufen auf $1,1 \times 10^7$ EBs/ well zu beobachten war (Abb. 15.D). Diese Zunahme könnte einer abklingenden Wirkung von $\text{IFN}\gamma$ undIDO sowie einer Supplementierung von Tryptophan durch Zugabe frischen Mediums zuzuschreiben sein. Dieser Aspekt muss bei den folgenden Experimenten berücksichtigt werden.

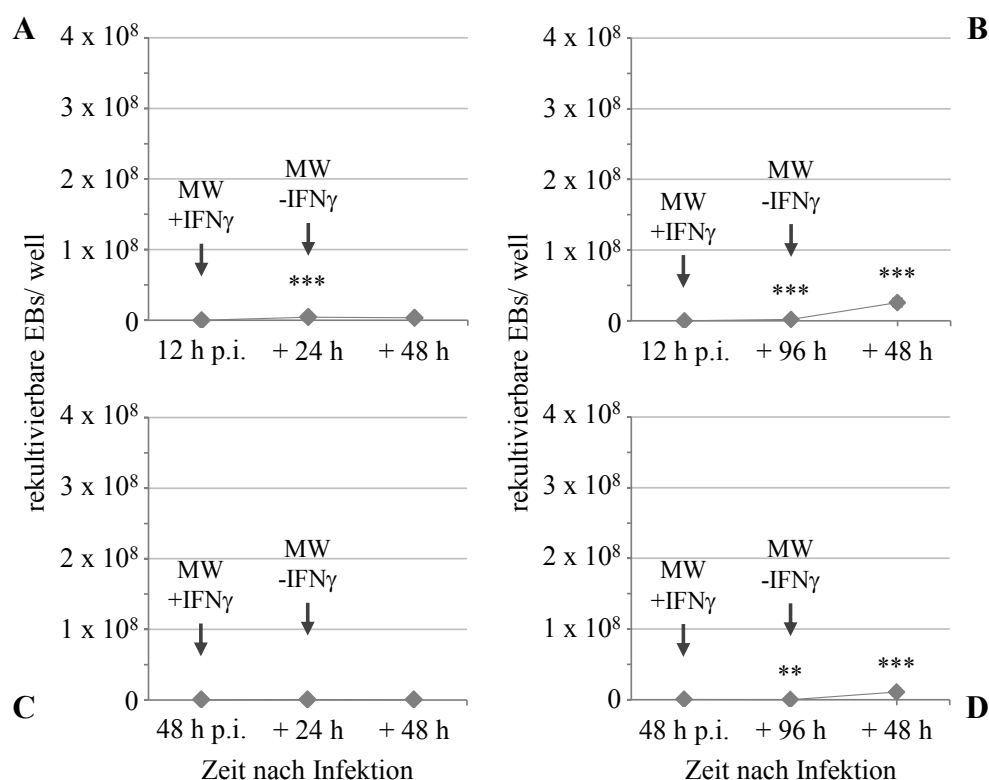


Abbildung 15: Rekultivierbarkeit persistenter *C. psittaci* zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion und (mehrmaligem) Mediumwechsel; \pm SEM; Rekultivierung nach A: 12, 36 und 84 h; B: 12, 108 und 156 h; C: 48, 72 und 120 h; D: 48, 144 und 192 h; MW: zu dem angegebenen Zeitpunkt erfolgte ein Austausch des Mediums, entweder mit (+) oder ohne (-) $\text{IFN}\gamma$; Sterne: signifikante Änderung der Anzahl der rekultivierbaren EBs im Vergleich zum vorhergehenden Zeitpunkt; zweiseitiger Student's T- Test: ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$**

Die Effizienz der Antibiotika bei Zugabe zu einem frühen Zeitpunkt ist gegenüber der persistenten *C. psittaci*- Infektion stark verringert im Vergleich zur replikativen Infektion

Wie aus Abbildung 16 hervorgeht, hatten die untersuchten Antibiotika bei Zugabe zum Zeitpunkt 12 h p.i. eine geringere Wirksamkeit gegenüber einer persistenten als gegenüber einer replikativen *C. psittaci*- Infektion.

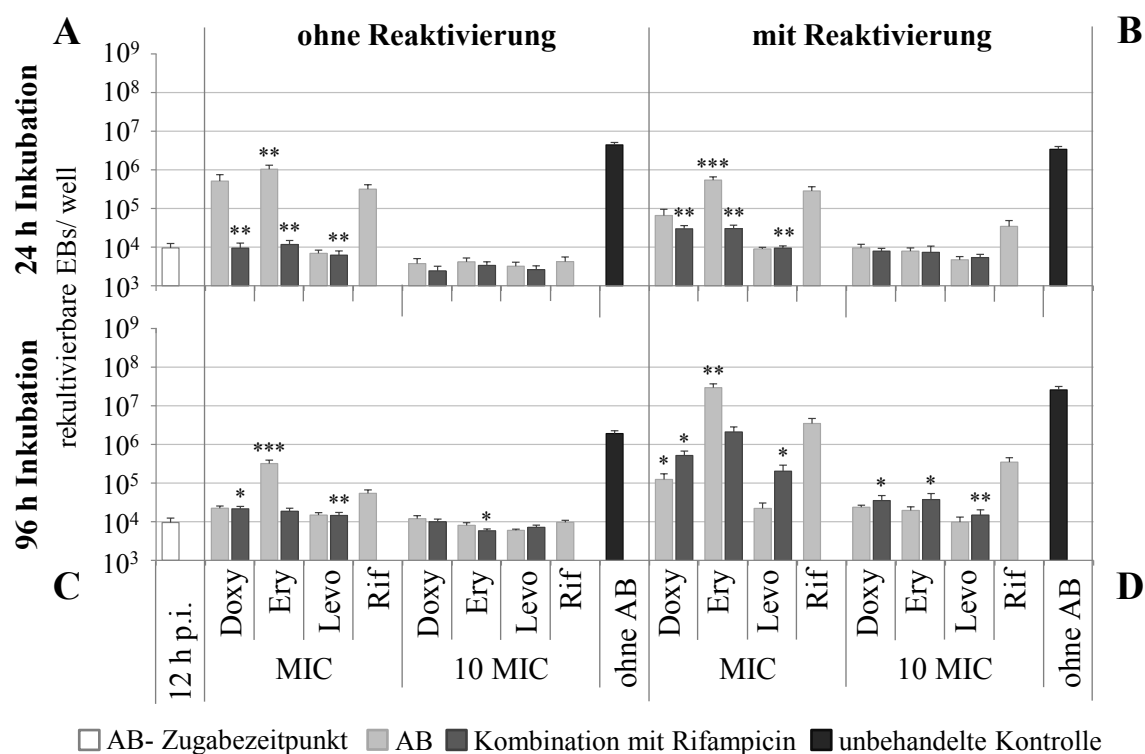


Abbildung 16: Reduktion der Anzahl rekultivierbarer Chlamydien nach Antibiotikabehandlung einer persistenten Infektion bei Zugabe der Antibiotika 12 h p.i.; 24- (A & B) bzw. 96- stündige (C & D) Inkubation, vor (A & C) und nach (B & D) 48- stündiger Inkubation in AB-freiem Medium; Sterne über den hellgrauen Säulen: Signifikanz zwischen Einzelbehandlung mit dem jeweiligen AB und seiner Kombination mit Rif, Sterne über den dunkelgrauen Säulen: Signifikanz zwischen Kombinations- Behandlung und Rif- Einzelbehandlung; zweiseitiger Student's T- Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; AB = Antibiotikum, MIC = minimale Hemmkonzentration, Doxy = Doxycyclin, Ery = Erythromycin, Levo = Levofloxacin, Rif = Rifampicin

Die Anwendung der einfachen MIC führte lediglich bei Behandlung mit Levofloxacin sowie Rifampicin- Kombinationen zu einer Reduktion der wiederanzüchtbaren Chlamydien um mehr als zwei \log_{10} - Stufen gegenüber der Antibiotika- unbehandelten, persistenten Kontrolle (Abb. 16.A). Die Wirksamkeit von Erythromycin, Rifampicin und insbes. Doxycyclin ließ sich durch Verlängerung der Inkubationsdauer auf 96 h verbessern (Abb. 16.C),

jedoch konnte für keines der Antibiotika dieselbe Effizienz erreicht werden wie gegen replikative Infektionen (vgl. Tabellen 19 und 21 im Anhang, Kapitel 11.3). Durch die Anwendung der zehnfachen MIC konnte ebenso eine Verbesserung der Wirksamkeit aller eingesetzten Antibiotika erzielt werden (Abb. 16.A und C). Hier war die Reduktion der rekultivierbaren EBs jedoch unabhängig von dem eingesetzten Antibiotikum, was analog zur replikativen Infektion auf einen bakteriostatischen Effekt hindeutet.

Dieser mögliche bakteriostatische Effekt wurde durch eine Reaktivierung der Chlamydien eingehender analysiert (Abb. 16.B und D). Die Anwendung der einfachen MIC mit nachfolgender Reaktivierung hatte eine Reduktion der rekultivierbaren EBs von bis zu zwei \log_{10} -Stufen gegenüber der jeweiligen Antibiotika-unbehandelten, persistenten Kontrolle zur Folge, wobei eine bessere Wirkung durch Kombination mit Rifampicin bzw. eine kürzere Inkubationsdauer erreicht wurde. Dies ist eine gegensätzliche Beobachtung zur Antibiotikabehandlung der replikativen Infektion, wo nach langer Inkubationsdauer i.d.R. eine bessere Wirksamkeit erzielt wurde. Möglicherweise ist dieser Effekt auf die abklingende Wirkung des IFN γ und den Austausch des verbrauchten Mediums zurückzuführen, wie es oben bereits beschrieben wurde. Auffällig war, dass durch Levofloxacin-Behandlung sogar eine Reduktion der rekultivierbaren EBs um bis zu drei \log_{10} -Stufen gegenüber der unbehandelten persistenten Kontrolle erzielt wurde und dass die Kombination mit Rifampicin eine deutlich geringere Wirksamkeit aufwies (Abb. 16.D). Die Anwendung der zehnfachen MIC hatte die Reduktion der Zahl rekultivierbarer EBs um zwei bis drei \log_{10} -Stufen gegenüber der unbehandelten Kontrolle zur Folge, wobei die längere Inkubationsdauer eine höhere Wirksamkeit nach sich zog (Abb. 16.B und D). Rifampicin war dabei das Antibiotikum mit der geringsten Effizienz und auch seine Kombinationen mit den anderen Antibiotika waren weniger wirksam als die Antibiotika wenn sie einzeln angewendet wurden.

Die Zugabe der Antibiotika zu einem späten Zeitpunkt verringert deutlich ihre Wirkung auf persistente *C. psittaci*

Die antibiotische Behandlung persistenter *C. psittaci* zum Zeitpunkt 48 h p.i. hatte eine geringfügige Reduktion der rekultivierbaren EBs gegenüber der entsprechenden unbehandelten Kontrolle zur Folge (Abb. 17.A und C). Lediglich Levofloxacin bewirkte eine Verringerung der rekultivierbaren EBs um mehr als eine \log_{10} -Stufe ($p < 0,01$; siehe Tabelle 22 im Anhang, Kapitel 11.3). Die Anwendung der zehnfachen MIC oder die Verlängerung der Inkubationsdauer erzielten eine höhere Wirksamkeit im Vergleich zur jeweiligen

Antibiotika- unbehandelten Kontrolle. Auch die Kombinationen mit Rifampicin waren etwas weniger wirksam als die Antibiotika in Einzelanwendung.

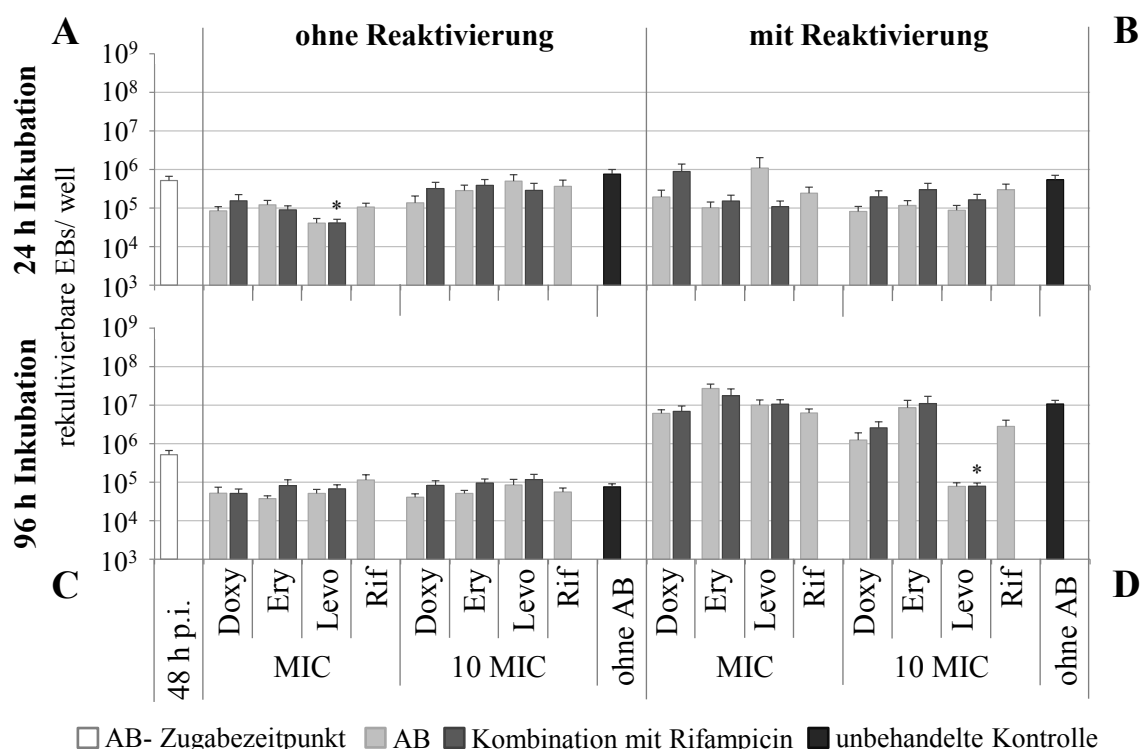


Abbildung 17: Reduktion der Anzahl rekultivierbarer Chlamydien nach Antibiotikabehandlung einer persistenten Infektion bei Zugabe der Antibiotika 48 h p.i.; 24- (A & B) bzw. 96- stündige (C & D) Inkubation, vor (A & C) und nach (B & D) 48- stündiger Inkubation in AB-freiem Medium; Sterne über den hellgrauen Säulen: Signifikanz zwischen Einzelbehandlung mit dem jeweiligen AB und seiner Kombination mit Rif, Sterne über den dunkelgrauen Säulen: Signifikanz zwischen Kombinations- Behandlung und Rif- Einzelbehandlung; zweiseitiger Student's T- Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; AB = Antibiotikum, MIC = minimale Hemmkonzentration, Doxy = Doxycyclin, Ery = Erythromycin, Levo = Levofloxacin, Rif = Rifampicin

Die Reaktivierung potentiell inhibierter Chlamydien durch Entzug von $\text{IFN}\gamma$ und Antibiotikum führte im Vergleich zu nicht- reaktivierten Proben zu einer Zunahme der Zahl der rekultivierbaren EBs (Abb. 17.B und D). Gegenüber der Antibiotika- unbehandelten Kontrolle zeigte sich dagegen keine signifikante Verringerung der Anzahl rekultivierbarer Chlamydien nach Behandlung mit der einfachen MIC. Interessanterweise erwiesen sich Levofloxacin und die Kombination von Doxycyclin und Rifampicin als am wenigsten wirksam nach 24- stündiger Inkubation (Abb. 17.B), während sie bei der Behandlung replikativer Infektionen i.d.R. die höchste Wirksamkeit aufwiesen. Die Anwendung der zehnfachen MIC führte zu einer leichten Steigerung der Wirksamkeit, jedoch ließen sich auch hier die rekultivierbaren EBs im Vergleich zur Antibiotika- unbehandelten Kontrolle um

weniger als eine \log_{10} - Stufe reduzieren (Abb. 17.B und D, Tabelle 22). Eine Ausnahme bildeten Levofloxacin und seine Kombination mit Rifampicin, welche die Anzahl rekultivierbarer EBs um mehr als zwei \log_{10} - Stufen ($p < 0,001$) gegenüber der Antibiotika- unbehandelten Kontrolle verringerten (Abb. 17.D).

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Zellkulturassays ableiten, dass replikative *C. psittaci* mit den getesteten Antibiotika gegenüber der entsprechenden unbehandelten Kontrolle besser zu eradizieren waren als persistente *C. psittaci*. Während die einfache MIC in den meisten Fällen bei Zugabe zu den Zeitpunkten 12 bzw. 48 h p.i. nur bakteriostatisch wirkte, konnte durch die zehnfache MIC eine bakterizide Wirkung erzielt werden. Dieser Effekt war bei replikativen Chlamydien ausgeprägter als bei persistenten Chlamydien, was auf eine höhere Widerstandsfähigkeit dieser aberranten Formen gegenüber Antibiotika bzw. höheren Konzentrationen spricht. Während Levofloxacin i.d.R. eine gute Wirksamkeit bei der Reduktion chlamydialer EBs zeigte, waren Erythromycin, Rifampicin und u.U. Doxycyclin weniger effektiv. Die Wirksamkeit von Doxycyclin und Erythromycin konnte jedoch durch Kombination mit Rifampicin gesteigert werden. Auch die Verlängerung der Inkubationsdauer mit Antibiotika hatte in den meisten Fällen einen positiven Einfluss auf die Wirksamkeit bei der Reduktion chlamydialer EBs.

3.3 Analyse der Wirksamkeit von Antibiotika anhand der differentiellen Genexpression von *Chlamydia psittaci*

Der Erfolg einer antibiotischen Therapie von Chlamydien lässt sich aufgrund der möglichen Inhibierung der Bakterien oder der Entstehung persistenter Formen nur schwer mittels Zellkulturverfahren evaluieren. Daher wurde die Reaktion der Chlamydien auf Antibiotikabehandlung auf molekularer Ebene untersucht, um somit geeignete Markergene für das Ansprechen auf eine antibiotische Therapie zu identifizieren.

Hierzu wurde der in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 beschriebene Zellkulturassay für replikative und persistente *C. psittaci* modifiziert und auf 6- well- Platten übertragen. Die zehnfache MIC der Antibiotika wurde eingesetzt, da sie im Allgemeinen die bessere Wirksamkeit gegenüber *C. psittaci* aufwies. Analog zu den Genexpressionsanalysen in Kapitel 3.1.3 wurden je Antibiotika- behandelter Kultur bzw. - unbehandelter Kontrolle zwei Parallelproben gewonnen. Da der möglichen Reduktion der rekultivierbaren Chlamydien unter Antibiotikagabe (durch bakterizide oder bakteriostatische Wirkung) eine Veränderung der Genexpression vorausgehen muss, wurden die Proben zu frühen Zeitpunkten nach Antibio-

tikagabe (12 bzw. 24 h) gewonnen und so die kurz- bis mittelfristige Antwort der Chlamydien auf die Antibiotikabehandlung erfasst.

Analog zu Kapitel 3.1.3 konnte die relative Anzahl chlamydialer Genomäquivalente im Verhältnis zur Wirtszell- *GAPDH* und das Verhältnis zur entsprechenden Antibiotika-unbehandelten Kontrolle bestimmt werden (siehe Formel 1 und 2). Abbildung 18 gibt dieses Verhältnis grafisch wieder.

Die Zugabe aller Antibiotika zu einer replikativen Infektion zum Zeitpunkt 12 h p.i. führte zu einer Reduktion der chlamydialen Genomäquivalente gegenüber der unbehandelten Kontrolle um mehr als eine bzw. zwei \log_{10} -Stufen nach 12 bzw. 24-stündiger Inkubation (Abb. 18.A, links). Kulturen, die mit Levofloxacin behandelt wurden, wiesen eine Verringerung von etwa drei \log_{10} -Stufen auf. Bei Zugabe der Antibiotika zum Zeitpunkt 48 h p.i. konnte eine Abnahme der chlamydialen Genome gegenüber der Antibiotika-unbehandelten Kontrolle von weniger als einer \log_{10} -Stufe beobachtet werden, wobei mit zunehmender Inkubationsdauer weniger Genomäquivalente im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar waren (Abb. 18.A, rechts). Dieser Effekt war unabhängig vom eingesetzten Antibiotikum.

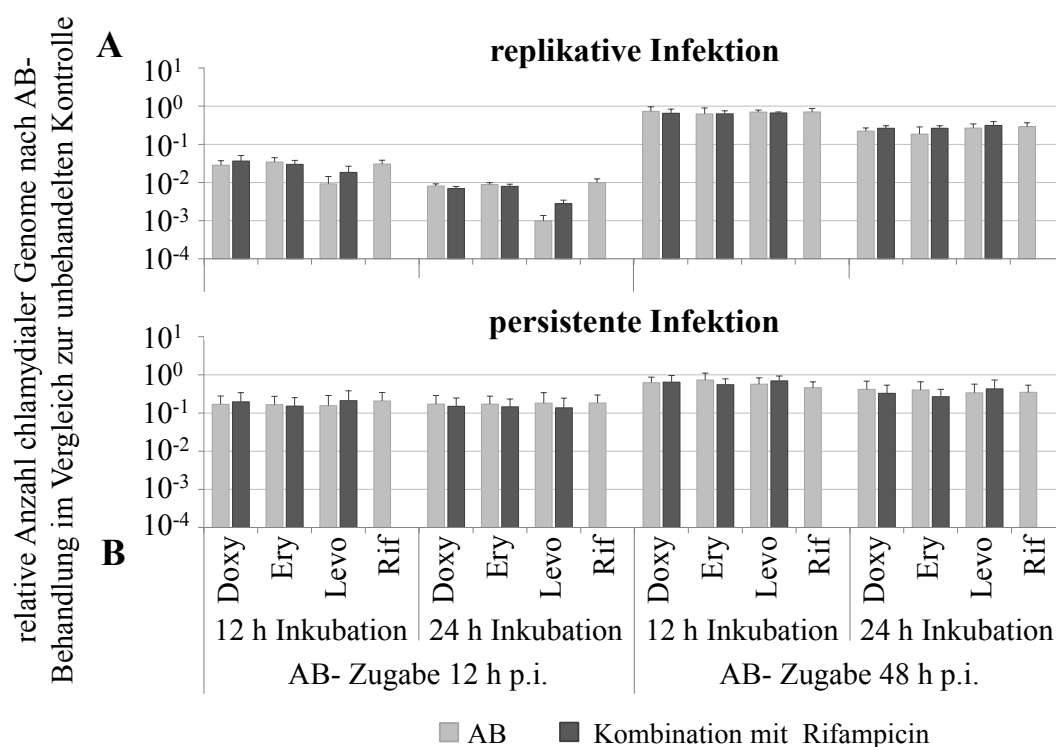


Abbildung 18: relative Anzahl chlamydialer Genome nach Antibiotikabehandlung replikativer (A) und persistenter (B) *C. psittaci* im Verhältnis zur AB-unbehandelten Kontrolle; \pm SEM; $n = 3$ bzw. 2 (Zugabe 12 bzw. 48 h p.i.); zweiseitiger Student's T-Test; AB = Antibiotikum, Doxy = Doxycyclin, Ery = Erythromycin, Levo = Levofloxacin, Rif = Rifampicin

Die antibiotische Behandlung persistenter *C. psittaci* hatte eine Reduktion der Genomäquivalente von weniger als einer \log_{10} - Stufe gegenüber der jeweiligen unbehandelten Kontrolle zur Folge. Dabei war die Verringerung bei früher Zugabe aber auch bei Behandlung mit Rifampicin- Kombinationen etwas stärker ausgeprägt (Abb. 18.B).

Anhand der Antibiotika- induzierten Reduktion von chlamydialen Genomen konnte hier die Wirksamkeit der Antibiotika gegen replikative aber nicht persistente *C. psittaci*- Infektionen, welche in den Zellkulturassays gezeigt wurde (siehe Kapitel 3.2.2 und 3.2.3), bestätigt werden. Jedoch lässt diese Methode keine Aussage darüber zu, ob die detektierte bakterielle genomische DNA lebensfähigen Chlamydien entspricht oder von abgetöteten Bakterien stammt.

Daher wurde die Transkriptionsaktivität ausgewählter chlamydialer Gene unter Antibiotikaeinfluss analysiert. Die Bestimmung der x- fachen Expressionsänderung chlamydialer Gene nach Antibiotikabehandlung gegenüber der entsprechenden unbehandelten Kontrolle erfolgte mit Hilfe der Formeln 1 und 2. Sie ist für ausgewählte Gene und jedes untersuchte Antibiotikum und seine Kombination mit Rifampicin in Tabelle 12 farbig codiert dargestellt. Die Tabelle soll einen Überblick darüber ermöglichen, welche Antibiotika unter welchen Umständen (replikative vs. persistente Infektion, frühe vs. späte Zugabe) eine differentielle Regulierung ausgewählter chlamydialer Gene bewirkten. Die exakten Werte befinden sich in den Tabellen 23 und 24 (Anhang, Kapitel 11.4) und werden ebenso in den Diagrammen der folgenden Unterkapitel grafisch dargestellt.

Es wird ersichtlich, dass replikative Chlamydien ihre Transkriptionsaktivität abhängig vom eingesetzten Antibiotikum und dem Zugabezeitpunkt im Vergleich zur entsprechenden unbehandelten Kontrolle veränderten. Zum Zugabezeitpunkt 12 h p.i. wurde durch Doxycyclin, Erythromycin und Levofloxacin eine Aktivierung der Transkription der Mehrzahl der untersuchten Gene verursacht. Dagegen führte die Behandlung mit Rifampicin (einzeln oder in Kombination) zu einer Herunterregulierung der Mehrzahl der untersuchten Gene gegenüber der jeweiligen Antibiotika- unbehandelten Kontrolle. Die Zugabe von Levofloxacin, Rifampicin und beiden Antibiotika in Kombination zum Zeitpunkt 48 h p.i. hatte die Hochregulation einiger Gene zur Folge, während die Kombination von Erythromycin und Rifampicin zu einer transienten Herunterregulation aller untersuchten Gene führte, welche 24 Stunden nach Zugabe der Antibiotika nicht mehr nachweisbar war.

Tabelle 12: Expressionsänderung ausgewählter chlamydialer Gene unter Antibiotika-behandlung replikativer und persistenter *C. psittaci*- Infektionen; zu den Zeitpunkten 12 und 48 h p.i.; Inkubation 12 bzw. 24 h; **rot: Hoch-**, **grün: Herunterregulation** um den Faktor ≥ 2 gegenüber der AB- unbehandelten Kontrolle; weiß: keine Regulation; n = 3 bzw. 2 (Zugabe 12 bzw. 48 h p.i.); Student's T- Test: * p < 0,05, ** p < 0,01, gegenüber der AB- unbehandelten Kontrolle

AB	Gen	replikative Infektion								persistente Infektion							
		+ AB 12 h p.i.				+ AB 48 h p.i.				+ AB 12 h p.i.				+ AB 48 hp.i.			
		AB		+ Rif		AB		+ Rif		AB		+ Rif		AB		+ Rif	
		12	24	12	24	12	24	12	24	12	24	12	24	12	24	12	24
Doxycyclin	<i>16S rRNA</i>																
	<i>gyrA</i>		*														
	<i>ompA</i>							*				*					
	<i>ftsW</i>																
	<i>amiB</i>																
	<i>amn</i>																
	<i>cpaf</i>					*											
	<i>sctN</i>																
	<i>Tsp</i>																
	<i>groEL</i>			**													
Erythromycin	<i>16S rRNA</i>																
	<i>gyrA</i>		*	*													
	<i>ompA</i>							*				*					
	<i>ftsW</i>																
	<i>amiB</i>																
	<i>amn</i>																
	<i>cpaf</i>		*														
	<i>sctN</i>							*									
	<i>Tsp</i>																
	<i>groEL</i>			**				*							*		
Levofloxacin	<i>16S rRNA</i>																
	<i>gyrA</i>																
	<i>ompA</i>									*		*		*		*	
	<i>ftsW</i>		*														
	<i>amiB</i>		*														
	<i>amn</i>																
	<i>cpaf</i>	*															
	<i>sctN</i>																
	<i>Tsp</i>																
	<i>groEL</i>	**															
Rifampicin	<i>16S rRNA</i>																
	<i>gyrA</i>	*															
	<i>ompA</i>									*				*			
	<i>ftsW</i>																
	<i>amiB</i>																
	<i>amn</i>																
	<i>cpaf</i>																
	<i>sctN</i>																
	<i>Tsp</i>																
	<i>groEL</i>	**															

Die persistente *C. psittaci*- Infektion reagierte auf die Zugabe von Levofloxacin und seiner Kombination mit Rifampicin zum Zeitpunkt 12 h p.i. mit einer Aktivierung der Transkription für die Mehrzahl der untersuchten Gene. Die Kombinationen von Doxycyclin und Erythromycin mit Rifampicin lösten dagegen die Verringerung der Transkription weniger untersuchter Gene aus.

Eine stärkere Regulation der Transkriptionsaktivität persistenter *C. psittaci* konnte durch Zugabe der Antibiotika 48 h p.i. erreicht werden. Hier lösten alle Antibiotika und ihre Kombinationen mit Rifampicin eine Aktivierung der Transkription mehrerer Gene aus. Dabei erfolgte die Hochregulierung nach Erythromycin- Behandlung nur 12 h nach Zugabe, während die anderen Antibiotika die Hochregulierung 24 h nach ihrer Zugabe vermittelten. Umfassend betrachtet führten Levofloxacin und seine Kombination mit Rifampicin gegenüber den anderen Antibiotika zu der ausgeprägtesten Veränderung der Transkriptionsaktivität replikativer und persistenter *C. psittaci*. Aber auch die Behandlung mit Rifampicin (einzeln oder in Kombination) verringerte die Transkription einiger Gene in der replikativen Infektion, während es die Transkriptionsaktivität persistenter *C. psittaci* steigerte.

Auch bei Betrachtung ausgewählter Gene im Überblick fällt eine differentielle Regulation ihrer Expression in replikativen bzw. persistenten Chlamydien auf. Vor allem *ompA*, welches mit Zellteilungsprozessen assoziiert wird, wurde weitestgehend herunterreguliert. Diese Verringerung der Transkriptionsaktivität gegenüber der entsprechenden Antibiotika-unbehandelten Kontrolle erfolgte auch, wenn die Transkription der Mehrzahl der Gene aktiviert wurde (z.B. Levofloxacin- Behandlung persistenter *C. psittaci*). Das Gen *Tsp* dagegen, welches mit der Pathogen- Wirt- Interaktion assoziiert ist, wurde nach antibiotischer Behandlung replikativer *C. psittaci* mehrheitlich herunterreguliert, während es in der persistenten Infektion nach Behandlung hochreguliert wurde. Auch *16S rRNA* und *gyrA*, wichtige Faktoren der Translation bzw. Replikation, wurden in der replikativen Infektion unter Antibiotikaeinfluss stärker differentiell reguliert als in der persistenten Infektion. *groEL*, welches ein Stressprotein codiert, wurde in der replikativen Infektion bei früher Zugabe und in der persistenten Infektion bei später Zugabe differentiell reguliert. Die genannten Gene werden in den folgenden Unterkapiteln eingehender besprochen.

16S rRNA (prozessierte Form)

Die x- fache Expressionsänderung der prozessierten Form der *16S rRNA* im Vergleich zur entsprechenden Antibiotika- unbehandelten Kontrolle ist in Abbildung 19 dargestellt.

Die Gabe von Doxycyclin, Erythromycin bzw. Levofloxacin zum Zeitpunkt 12 h p.i. führte zu einer Hochregulation der prozessierten Form der *16S rRNA* im Vergleich zur Antibiotika- unbehandelten Kontrolle, welche zu beiden Probenahmezeitpunkten (12 und 24 h nach Zugabe) nachweisbar war (Abb. 19.A, links). Durch Zugabe von Rifampicin (einzeln oder in Kombination) konnte keine Veränderung der Transkriptionsaktivität hervorgerufen werden. Die späte Zugabe zu einer replikativen *C. psittaci*- Infektion führte überwiegend in Levofloxacin- bzw. Rifampicin- behandelten Kulturen zu einer Verringerung der Transkriptmengen gegenüber der jeweiligen Kontrolle (Abb. 19.A, rechts).

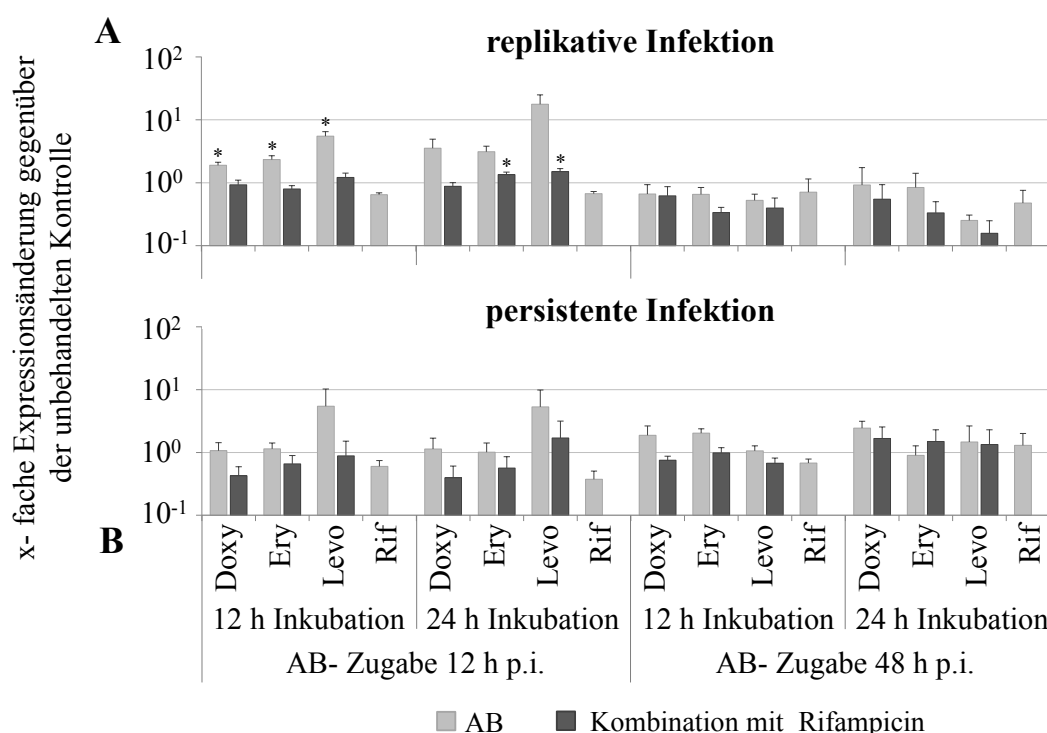


Abbildung 19: relative Expression der prozessierten Form der *16S rRNA* nach Antibiotikabehandlung replikativer (A) bzw. persistenter (B) *C. psittaci* im Verhältnis zur AB- unbehandelten Kontrolle; \pm SEM; Normalisierung gegen chlamydiale genomische DNA; Sterne über den hellgrauen Säulen: Signifikanz zwischen Einzelbehandlung mit dem jeweiligen AB und seiner Kombination mit Rif, Sterne über den dunkelgrauen Säulen: Signifikanz zwischen Kombinations-Behandlung und Rif- Einzelbehandlung; $n = 3$ bzw. 2 (Zugabe 12 bzw. 48 h p.i.); zweiseitiger Student's T- Test: $* p < 0,05$; AB = Antibiotikum, Doxy = Doxycyclin, Ery = Erythromycin, Levo = Levofloxacin, Rif = Rifampicin

Die Transkription der prozessierten Form der *16S rRNA* unterlag nach Antibiotikabehandlung der persistenten Infektion kaum einer Regulierung gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 19.B, links). Rifampicin (einzeln, in Kombination mit Doxycyclin) führte zu einer leichten Abnahme der Transkription um mehr als die Hälfte, während Levofloxacin

die Hochregulation des Gens um das 5- fache verursachte. Zum späteren Zugabezeitpunkt wurde keine differentielle Transkription von *16S rRNA* unter Antibiotikabehandlung ausgelöst (Abb. 19.B, rechts).

Replikation und Zellteilung (*ompA*, *ftsW*)

Das Gen für das chlamydiale major outer membrane porin, *ompA*, wurde nach Antibiotikabehandlung replikativer *C. psittaci* stark differentiell reguliert (Abb. 20.A).

Die Gabe von Levofloxacin bzw. Rifampicin (einzeln und in Kombination) zum Zeitpunkt 12 h p.i. führte zu einer starken Verringerung der Transkriptmenge um mehr als eine \log_{10} -Stufe gegenüber der Antibiotika- unbehandelten Kontrolle. Dahingegen wurde durch Doxycyclin und Erythromycin eine Steigerung der Transkriptionsaktivität um das drei- bis sechs- fache gegenüber der Kontrolle hervorgerufen (Abb. 20.A, links). Infolge späterer Antibiotikagabe 48 h p.i. zeigten die Chlamydien eine geringer ausgeprägte differentielle Transkription von *ompA*.

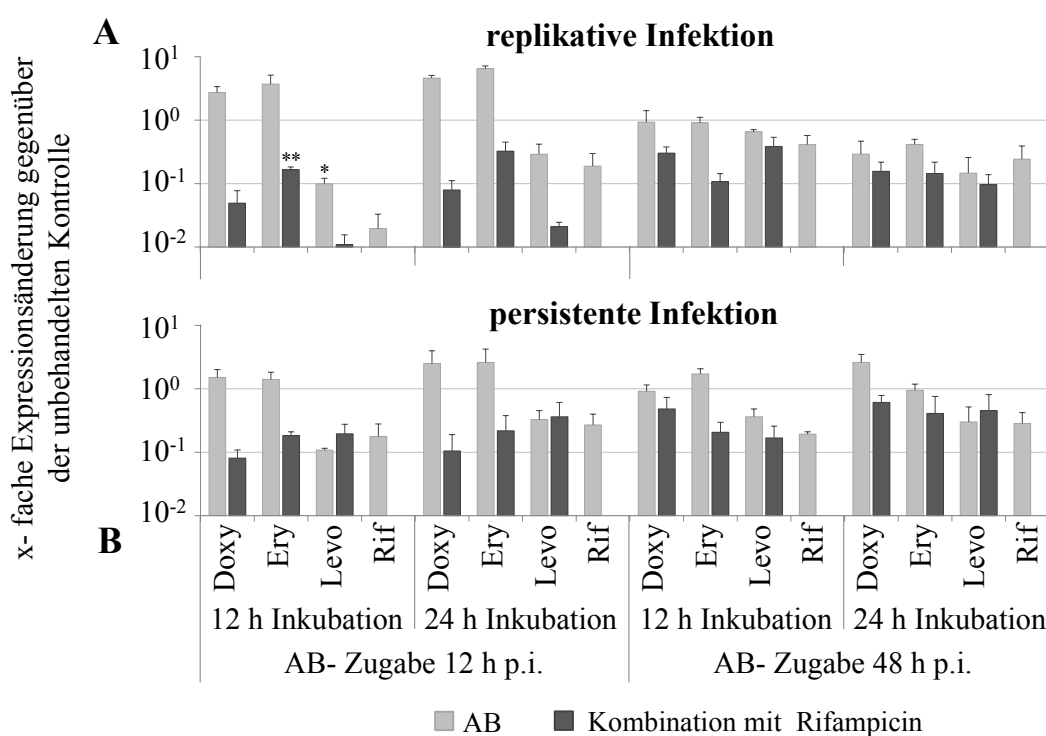


Abbildung 20: relative Expression von *ompA* nach Antibiotikabehandlung replikativer (A) bzw. persistenter (B) *C. psittaci* im Verhältnis zur AB- unbehandelten Kontrolle; \pm SEM; Normalisierung gegen chlamydiale genomische DNA; Sterne über den hellgrauen Säulen: Signifikanz zwischen Einzelbehandlung mit dem jeweiligen AB und seiner Kombination mit Rif, Sterne über den dunkelgrauen Säulen: Signifikanz zwischen Kombinations- Behandlung und Rif- Einzelbehandlung; n = 3 bzw. 2 (Zugabe 12 bzw. 48 h p.i.); zweiseitiger Student's T- Test: * p < 0,05, ** p < 0,01; AB = Antibiotikum, Doxy = Doxycyclin, Ery = Erythromycin, Levo = Levofloxacin, Rif = Rifampicin

Während alle angewendeten Antibiotika keine Reduktion der Transkription verursachten, wenn sie einzeln angewendet wurden, konnte durch Kombination mit Rifampicin eine deutliche Verringerung der Transkriptionsaktivität erzielt werden. Auch die Verlängerung der Inkubationsdauer auf 24 h führte zu einer weiteren Reduktion der *ompA*-Transkripte in Relation zur Antibiotika-unbehandelten Kontrolle (Abb. 20.A, rechts).

Die Antibiotikabehandlung persistenter *C. psittaci* verursachte ein ähnliches Transkriptionsmuster wie die Behandlung replikativer Chlamydien, jedoch waren die Veränderungen gegenüber der entsprechenden unbehandelten Kontrolle schwächer ausgeprägt (Abb. 20.B). Zum Zugabezeitpunkt 12 h p.i. führte die Behandlung mit Doxycyclin und Erythromycin lediglich zu einer leichten Hochregulation von *ompA* um das zweifache gegenüber der Kontrolle (Abb. 20.B, links). Durch die anderen Antibiotika ließ sich eine Verringerung der Transkription um bis zu eine \log_{10} -Stufe erzielen. Im Gegensatz zur replikativen Infektion ließ sich der inhibitorische Einfluss von Levofloxacin auf die *ompA*-Transkription nicht durch Kombination mit Rifampicin verstärken. Die späte Zugabe der Antibiotika führte überwiegend zu einer Herunterregulation der *ompA*-Transkripte, welche sich nach 24-stündiger Inkubationsdauer wieder dem Niveau der unbehandelten Kontrolle annäherte (Abb. 20.B, rechts). Auch hier bildeten *C. psittaci*, welche mit Doxycyclin bzw. Erythromycin behandelt wurden eine Ausnahme, indem sie die *ompA*-Transkription nicht herunterregulierten.

Das Gen *ftsW*, welches für ein Zellteilungsprotein codiert, war ebenfalls teilweise stark reguliert (Abb. 21), jedoch vor allem in Levofloxacin-behandelten *C. psittaci* (einzeln und in Kombination mit Rifampicin) in entgegengesetzter Weise zu *ompA*.

Durch Doxycyclin, Erythromycin sowie Levofloxacin wurde bei früher Zugabe zu einer replikativen Infektion eine Aktivierung der *ftsW*-Transkription verursacht, während Rifampicin (einzeln und in Kombination) nach 12-stündiger Inkubation keinen Einfluss gegenüber der unbehandelten Kontrolle aufwies. Die Verlängerung der Inkubationsdauer auf 24 h führte dagegen zu einer deutlichen Hochregulation der Transkripte in allen Antibiotika-behandelten Kulturen (Abb. 21.A, links). Die späte Zugabe der Antibiotika zu replikativen *C. psittaci* zog keine signifikante Änderung der *ftsW*-Transkription in Relation zur unbehandelten Kontrolle nach sich (Abb. 21.A, rechts).

Die zeitige Behandlung der persistenten Infektion mit Levofloxacin und seiner Kombination mit Rifampicin hatte eine Hochregulation der *ftsW*-Transkription im Vergleich zur Kontrolle zur Folge. Die anderen untersuchten Antibiotika hatten keinen regulierenden Einfluss auf die Transkription (Abb. 21.B, links). Auch die späte Antibiotikagabe verur-

sachte erst nach 24- stündiger Inkubationsdauer eine moderate Hochregulation von *ftsW*, allerdings unabhängig vom eingesetzten Antibiotikum (Abb. 21.B, rechts).

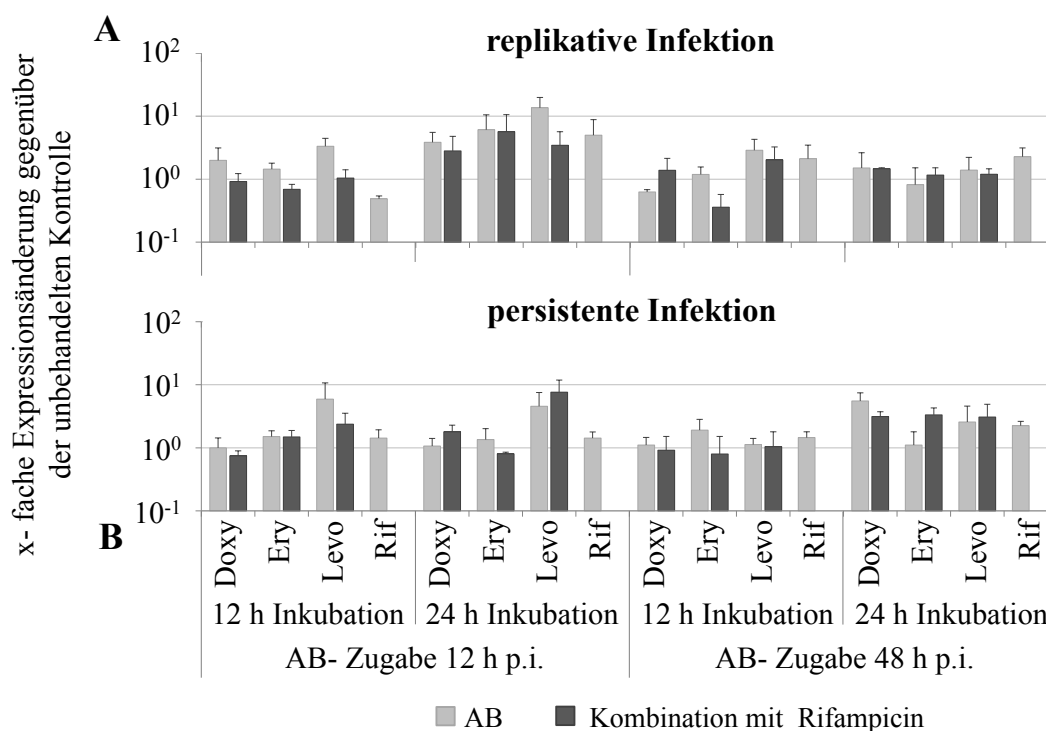


Abbildung 21: relative Expression von *ftsW* nach Antibiotikabehandlung replikativer (A) bzw. persistenter (B) *C. psittaci* im Verhältnis zur AB- unbehandelten Kontrolle; \pm SEM; Normalisierung gegen chlamydiale genomische DNA; n = 3 bzw. 2 (Zugabe 12 bzw. 48 h p.i.); zweiseitiger Student's T- Test; AB = Antibiotikum, Doxy = Doxycyclin, Ery = Erythromycin, Levo = Levofloxacin, Rif = Rifampicin

Pathogen- Wirt- Interaktion (*Tsp*)

Die differentielle Transkription von *Tsp* unter Antibiotikabehandlung ist in Abbildung 22 dargestellt.

Die frühe Antibiotikabehandlung einer replikativen Infektion führte zu einer starken Herunterregulation des Gens *Tsp*, welches für eine in das Wirtszellzytosol sezernierte chlamydiale Protease codiert, um bis zu mehr als eine log₁₀- Stufe gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 22.A, links). Dabei hatte Rifampicin bei der Reduktion der Transkripte eine verstärkende Wirkung auf die anderen Antibiotika. Nach längerer Inkubationsdauer nahm das Transkriptionsniveau von *Tsp* gegenüber der Kontrolle wieder zu. Die späte Zugabe der Antibiotika hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die Transkription von *Tsp* in der replikativen Infektion (Abb. 22.A, rechts).

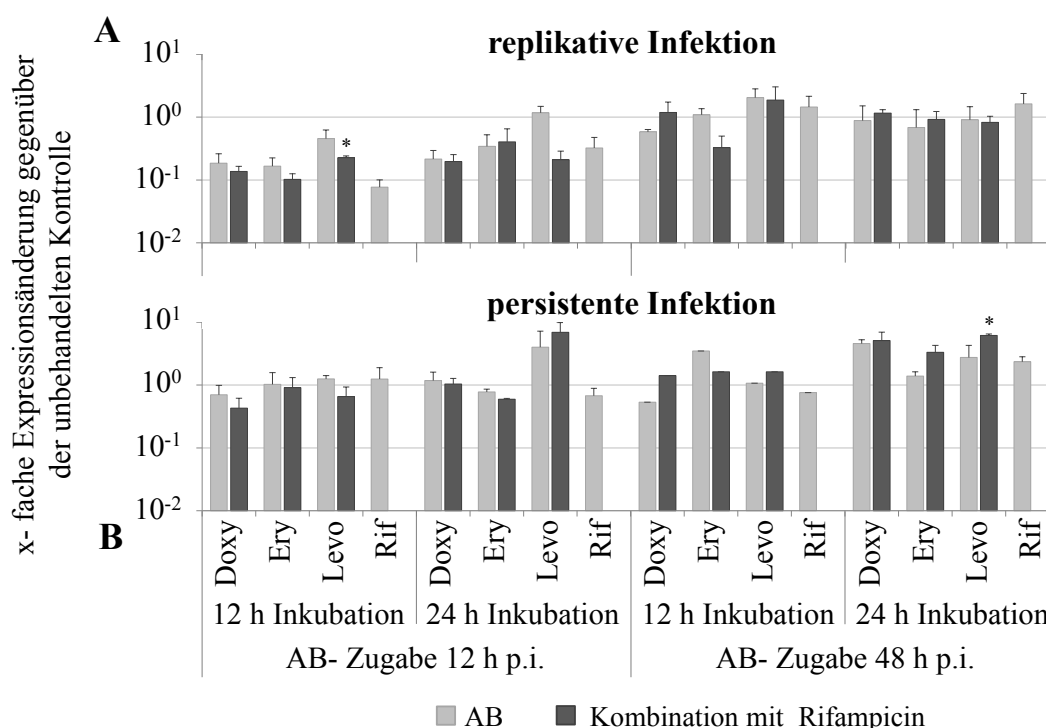


Abbildung 22: relative Expression von *Tsp* nach Antibiotikabehandlung replikativer (A) bzw. persistenter (B) *C. psittaci* im Verhältnis zur AB-unbehandelten Kontrolle; \pm SEM; Normalisierung gegen chlamydiale genomische DNA; Sterne über den dunkelgrauen Säulen: Signifikanz zwischen Kombinations- Behandlung und Rif- Einzelbehandlung; $n = 3$ bzw. 2 (Zugabe 12 bzw. 48 h p.i.); zweiseitiger Student's T- Test: $* p < 0,05$; AB = Antibiotikum, Doxy = Doxycyclin, Ery = Erythromycin, Levo = Levofloxacin, Rif = Rifampicin

In der persistenten Infektion wurde das *Tsp*-Transkript bei Zugabe der Antibiotika 12 h p.i. gegenüber der Antibiotika-unbehandelten Kontrolle nicht differentiell reguliert (Abb. 22.B, links). Lediglich die Zugabe von Levofloxacin und seiner Kombination mit Rifampicin führte nach längerer Inkubation zu einer Aktivierung der Transkription. Die Zugabe der Antibiotika 48 h p.i. hatte nach 24- stündiger Inkubation einen bis zu 6- fachen Anstieg der Expression in Relation zur Antibiotika-unbehandelten Kontrolle zur Folge, wobei sich aber keine Abhängigkeit von einem spezifischen Antibiotikum zeigte (Abb. 22.B, rechts).

Stressantwort (*groEL*)

Da eine antibiotische Behandlung für die Chlamydien einen Stressstimulus darstellt, wurde die Expression des Gens *groEL*, welches das heat shock protein 60 codiert, analysiert.

Die frühe Behandlung replikativer *C. psittaci*- Infektionen hatte eine deutliche, Antibiotika- spezifische differentielle Transkription von *groEL* zur Folge (Abb. 23.A, links). So wurde die Anzahl der Transkripte nach Doxycyclin-, Erythromycin- bzw. Levofloxa-

cin- Behandlung mit zunehmender Inkubationsdauer im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hochreguliert, wohingegen die Anwendung von Rifampicin allein bzw. in Kombination zu einer deutlichen Verringerung der Anzahl der Transkripte führte, welche sich nach längerer Inkubationsdauer jedoch wieder der Transkriptmenge der unbehandelten Kontrolle annäherte. Die späte Zugabe der Antibiotika zu einer replikativen Infektion hatte dagegen keinen nennenswerten Einfluss auf die Transkription von *groEL* (Abb. 23.A, rechts).

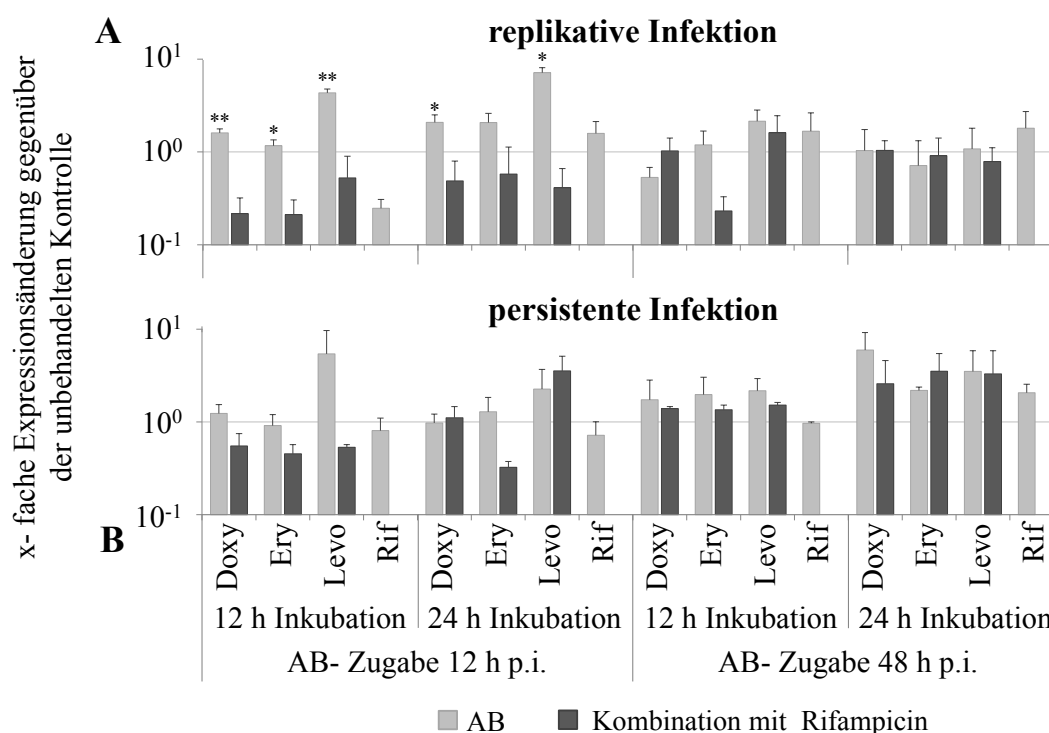


Abbildung 23: relative Expression von *groEL* nach Antibiotikabehandlung replikativer (A) bzw. persistenter (B) *C. psittaci* im Verhältnis zur AB- unbehandelten Kontrolle; ± SEM; Normalisierung gegen chlamydiale genomische DNA; Sterne über den hellgrauen Säulen: Signifikanz zwischen Einzelbehandlung mit dem jeweiligen AB und seiner Kombination mit Rif, Sterne über den dunkelgrauen Säulen: Signifikanz zwischen Kombinations- Behandlung und Rif- Einzelbehandlung; n = 3 bzw. 2 (Zugabe 12 bzw. 48 h p.i.); zweiseitiger Student's T- Test: * p < 0,05, ** p < 0,01; AB = Antibiotikum, Doxy = Doxycyclin, Ery = Erythromycin, Levo = Levofloxacin, Rif = Rifampicin

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, wurde *groEL* in der persistenten Infektion bei früher Zugabe der Antibiotika im Gegensatz zur replikativen Infektion kaum differentiell reguliert (Abb. 23.B, links). Eine Ausnahme bildeten Kulturen, die mit Levofloxacin und seiner Kombination mit Rifampicin behandelt wurden, welche eine Hochregulation der *groEL*-Transkripte aufwiesen. Die spätere Zugabe der Antibiotika führte, vor allem nach längerer Inkubationsdauer und unabhängig von den applizierten Antibiotika, zu einem moderaten

Anstieg der *groEL*- Transkription gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 23.B, rechts).

3.4 Untersuchung der Wirtszellgenexpression in Antibiotika- behandelten und - unbehandelten *C. psittaci*- infizierten A549- Zellen

Neben der differentiellen Genexpression der Chlamydien lag ein weiterer Fokus dieser Arbeit auf der differentiellen Transkription von Wirtszellgenen. Hierbei sollte die Reaktion der Wirtszellen auf eine replikative bzw. persistente *C. psittaci*- Infektion untersucht werden, um daraus Rückschlüsse auf Entzündungs- und Tissue Remodeling- Prozesse während einer Infektion bzw. unter einer antibiotischen Therapie ziehen zu können.

Mit Hilfe von Microarray- Analysen (Firma SIRS Lab, Jena) wurde in einem Pilotversuch die Genexpression in einem Zellkulturmodell von *C. psittaci*- infizierten bzw. nicht- infizierten A549- Zellen mit und ohne IFN γ - Behandlung analysiert. Aus einer Vielzahl hoch-regulierter Gene wurden einige, bzgl. der oben genannten Prozesse interessante Gene ausgewählt und deren Expression 2 und 24 h p.i. untersucht (MEINHARDT 2011). Die differentielle Transkription einiger dieser Gene, welche in Tabelle 13 angegeben sind, wurde in der vorliegenden Arbeit bis zu 72 h p.i. analysiert. Diese Ergebnisse werden in Kapitel 3.4.1 vorgestellt.

Tabelle 13: zur Analyse ausgewählte Wirtszellgene

Gen	Genprodukt	Funktion
<i>CD55</i>	complement decay-accelerating factor	Teil des Komplement- Systems
<i>CDC2</i>	cyclin- abhängige Kinase 1	Einleitung der S- Phase der Mitose
<i>CXCL5</i>	C-X-C motif chemokine 5	Chemotaxis und Aktivierung von Neutrophilen
<i>IL-8</i>	Interleukin 8	u.a. Entzündungsmediator
<i>SOCS2</i>	suppressor of cytokine signalling 2	Negativ- Regulator der Zytokin- Produktion
<i>TNFRSF9</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	Stimulation von aktivierten T- Zellen

3.4.1 Differentielle Regulierung von Wirtszellgenen in der replikativen und persistenten *C. psittaci*- Infektion

Die Bestimmung der differentiellen Genexpression verschiedener Wirtszellgene wurde analog zu Kapitel 3.1.3 durchgeführt, jedoch wurden die A549- Zellen in DMEM kultiviert und die reverse Transkription fand unter Verwendung von oligo(dT)- Primern statt. Es wurde je Kultur nur eine Probe benötigt, da gegen die *GAPDH* der Wirtszelle normalisiert

wurde. Als unbehandelte Kontrollen diente die jeweilige nicht- infizierte und mit oder ohne IFN γ - behandelte Kultur.

Aus Tabelle 14 wird ersichtlich, dass die analysierten Gene in einer *C. psittaci*- Infektion im Vergleich zur entsprechenden nicht- infizierten Kontrolle mehrheitlich heraufreguliert wurden.

Tabelle 14: Expressionsänderung von Wirtszellgenen im Zeitverlauf in der replikativen bzw. persistenten *C. psittaci*- Infektion im Vergleich zur jeweiligen nicht-infizierten Kontrolle; rot: Hoch-, grün: Herunterregulation um den Faktor ≥ 2 ; weiß: keine Regulation; n = 4; zweiseitiger Student's T- Test: * p < 0,05, ** p < 0,01

Gen	Infektion	x- fache Expressionsänderung gegenüber der nicht- infizierten Kontrolle (mit bzw. ohne IFN γ)				
		12 h p.i.	24 h p.i.	36 h p.i.	48 h p.i.	72 h p.i.
CD55	replikativ	1,64 \pm 0,52	1,10 \pm 0,11	1,28 \pm 0,17	1,34 \pm 0,09	2,3 \pm 0,6
	persistent	1,00 \pm 0,16	1,27 \pm 0,11	1,34 \pm 0,14	1,43 \pm 0,21	1,18 \pm 0,10
CDC2	replikativ	0,66 \pm 0,05	0,97 \pm 0,23	0,75 \pm 0,18	1,36 \pm 0,25	1,57 \pm 0,55
	persistent	0,93 \pm 0,24	0,49 \pm 0,03	1,89 \pm 0,41	0,72 \pm 0,18	2,4 \pm 1,2
CXCL5	replikativ	2,6 \pm 1,3	1,46 \pm 0,11	1,28 \pm 0,10	1,48 \pm 0,04	3,5 \pm 1,7
	persistent	1,26 \pm 0,19	1,41 \pm 0,12	1,08 \pm 0,07	1,10 \pm 0,09	1,38 \pm 0,17
IL-8	replikativ	15,0 \pm 10,9	1,80 \pm 0,27	2,4 \pm 0,3	5,4 \pm 0,6**	58,3 \pm 45,4
	persistent	5,7 \pm 0,57	2,5 \pm 0,3	1,62 \pm 0,14	2,2 \pm 0,4	2,1 \pm 0,2
SOCS2	replikativ	1,24 \pm 0,24	0,85 \pm 0,04	1,09 \pm 0,05	0,99 \pm 0,08	2,4 \pm 1,3
	persistent	1,55 \pm 0,17	0,96 \pm 0,12	1,50 \pm 0,09	0,94 \pm 0,19	2,3 \pm 0,5
TNFRSF9	replikativ	2,7 \pm 0,6	2,8 \pm 0,8*	3,7 \pm 1,0	3,5 \pm 0,6*	23,4 \pm 9,6
	persistent	3,0 \pm 0,6*	3,1 \pm 0,4*	2,1 \pm 0,3	2,1 \pm 0,3	2,4 \pm 0,5

Dabei waren *IL-8* und *TNFRSF9* sowohl in der replikativen als auch persistenten Infektion über den gesamten Zeitverlauf moderat bis stark hochreguliert. Im Gegenzug dazu konnte für die anderen untersuchten Gene keine nennenswerte differentielle Transkription erzielt werden. Lediglich zu dem Zeitpunkt 72 h p.i. konnte für die Gene *CD55* und *SOCS2* eine leichte Hochregulation nachgewiesen werden.

Abbildung 24 zeigt die relative Expression von *IL-8* gegenüber *GAPDH* in replikativer und persistenter Infektion sowie in den entsprechenden nicht- infizierten Kontrollen.

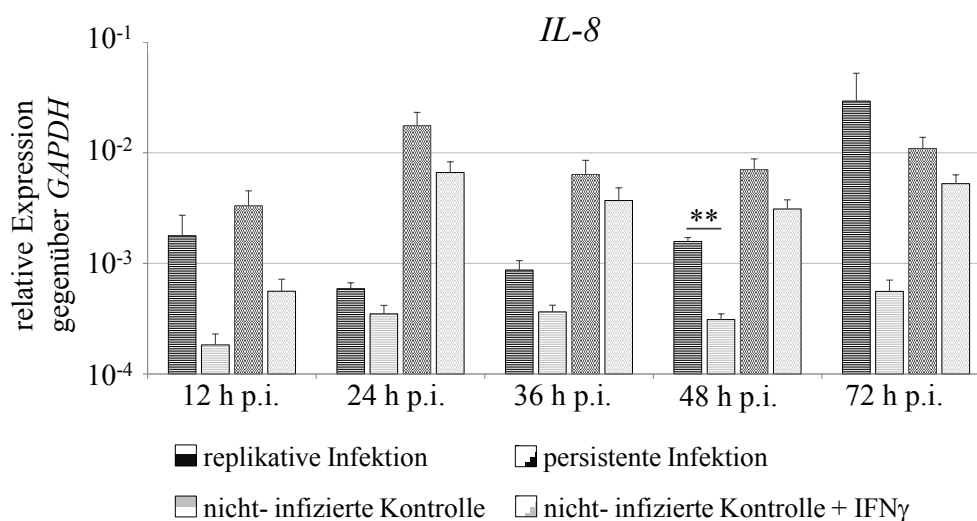


Abbildung 24: relative Expression von *IL-8* in replikativer und persistenter Infektion von A549- Zellen und in entsprechenden nicht- infizierten Kontrollen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion im Verhältnis zu *GAPDH*; \pm SEM; Sterne: Signifikanz zwischen infizierten Zellen und entsprechender nicht- infizierter Kontrolle; n = 4; zweiseitiger Student's T- Test: ** p < 0,01

Nicht- infizierte, IFN γ - unbehandelte Zellen wiesen eine geringfügige, konstitutive Expression von *IL-8* auf, welche während des beobachteten Zeitraums nahezu konstant blieb (helle horizontale Streifen). Durch Infektion mit *C. psittaci* wurde die *IL-8*- Transkription zunächst aktiviert (12 h p.i.), zum Zeitpunkt 24 h p.i. verringert und stieg bis 72 h p.i. wieder an (dunkle horizontale Streifen). Durch IFN γ konnte ebenfalls eine Steigerung der Zahl der *IL-8*- Transkripte erzielt werden (helle Schraffur), welche sich durch die persistente Infektion der Zellen mit *C. psittaci* weiter erhöhen ließ (dunkle Schraffur).

Die relative Expression von *TNFRSF9* ist in Abbildung 25 dargestellt. In nicht- infizierten, IFN γ - unbehandelten Zellen konnte eine konstitutive Transkription von *TNFRSF9* nachgewiesen werden, welche im Verhältnis zur *GAPDH* im Verlauf des Untersuchungszeitraums leicht abnahm (helle horizontale Streifen). Die Infektion mit *C. psittaci* löste eine Zunahme der Transkriptmenge aus, welche zum Zeitpunkt 72 h p.i. mehr als eine log₁₀- Stufe betrug (dunkle horizontale Streifen).

Durch IFN γ - Behandlung nicht- infizierter Zellen wurde eine erhebliche Verstärkung der konstitutiven *TNFRSF9*- Transkription verursacht, wobei sich die Anzahl der Transkripte

in Relation zur *GAPDH* mit zunehmender Inkubationsdauer erhöhte (helle Schraffur). Durch Infektion mit *C. psittaci* und Etablierung einer persistenten Infektion konnte ein weiterer Anstieg der *TNFRSF9*- Transkription gegenüber der nicht- infizierten Kontrolle erzielt werden, der ebenfalls während des Untersuchungszeitraums zunahm (dunkle Schraffur).

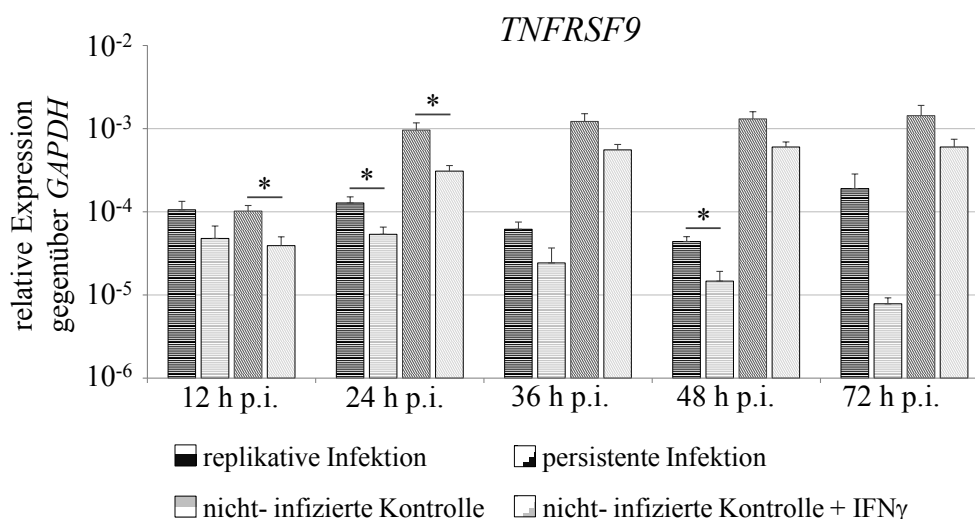


Abbildung 25: relative Expression von *TNFRSF9* in replikativer und persistenter Infektion von A549- Zellen und in entsprechenden nicht- infizierten Kontrollen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion im Verhältnis zu *GAPDH*; \pm SEM; Sterne: Signifikanz zwischen infizierten Zellen und entsprechender nicht- infizierter Kontrolle; n = 4; zweiseitiger Student's T- Test: * p < 0,05

3.4.2 Veränderung der Wirtszellgenexpression nach Antibiotikabehandlung von *C. psittaci*- infizierten Zellen

Um die Antwort der Wirtszellen auf eine antibiotische Behandlung replikativer und persistenter *C. psittaci*- Infektionen zu analysieren, wurde das in Kapitel 3.3 beschriebene Modell angewendet. Ergänzend wurde für jede Antibiotika- behandelte Probe die entsprechende nicht- infizierte Kontrolle angelegt, um mögliche nicht- antimikrobielle Effekte der Antibiotika ausschließen zu können. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM- Medium und die reverse Transkription wurde mit oligo(dT)- Primern durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen *GAPDH* (Formel 1) und die x- fache Expressionsänderung wurde gegenüber der jeweiligen Antibiotika- unbehandelten Kontrolle (Formel 2) angegeben.

Da in der replikativen und persistenten *C. psittaci*- Infektion im Wesentlichen die Wirtszellgene *IL-8* und *TNFRSF9* hochreguliert waren, wird deren Transkriptionänderung unter Antibiotikabehandlung vorgestellt (Tabelle 15).

Beide Gene wurden unter Antibiotikabehandlung herunterreguliert, wobei die Transkriptionsänderung in der replikativen Infektion bei Antibiotika- Gabe 48 h p.i. eintrat, während persistente Infektionen nach frühzeitiger Zugabe der Antibiotika reagierten. Diese Effekte waren Antibiotika- unabhängig. Auch nicht- antimikrobielle, immunmodulatorische Effekte der Antibiotika auf die Transkription der genannten Gene wurden ausgeschlossen.

Tabelle 15: Expressionsänderung von *IL-8* und *TNFRSF9* unter Antibiotikabehandlung replikativer und persistenter Infektionen im Vergleich zur jeweiligen AB- unbehandelten Kontrolle; grün: Herunterregulation um den Faktor ≥ 2 ; weiß: keine Regulation; n = 2; AB = Antibiotikum, Doxy = Doxycyclin, Ery = Erythromycin, Levo = Levofloxacin, Rif = Rifampicin

AB	Gen	replikative Infektion								persistente Infektion							
		+ AB 12 h p.i.				+ AB 48 h p.i.				+ AB 12 h p.i.				+ AB 48 h p.i.			
		AB		+ Rif		AB		+ Rif		AB		+ Rif		AB		+ Rif	
		12	24	12	24	12	24	12	24	12	24	12	24	12	24	12	24
Doxy	<i>IL-8</i>																
	<i>TNFRSF9</i>																
Ery	<i>IL-8</i>																
	<i>TNFRSF9</i>																
Levo	<i>IL-8</i>																
	<i>TNFRSF9</i>																
Rif	<i>IL-8</i>																
	<i>TNFRSF9</i>																

Herunterregulierung von *IL-8* als Indikator für die Effizienz der Antibiotika gegen *C. psittaci*

Abbildung 26 stellt die Expressionsänderung von *IL-8* nach Antibiotikabehandlung grafisch dar.

Durch die Antibiotikagabe zum Zeitpunkt 12 h p.i. zu replikativen *C. psittaci*- Infektionen wurde eine leichte Herunterregulierung der *IL-8*- Transkription verursacht (Abb. 26.A, links). Die spätere Zugabe führte zu einer Verringerung der Transkription von *IL-8* um etwa die Hälfte im Vergleich zur Antibiotika- unbehandelten Kontrolle. Im weiteren Verlauf der Antibiotikabehandlung (24 h nach Zugabe) reduzierte sich die Transkriptionsaktivität

auf ein Fünftel gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 26.A, rechts). Diese relativ starke Inhibierung der *IL-8*- Transkription könnte auf eine bakteriostatische oder bakterizide Wirkung der Antibiotika hinweisen.

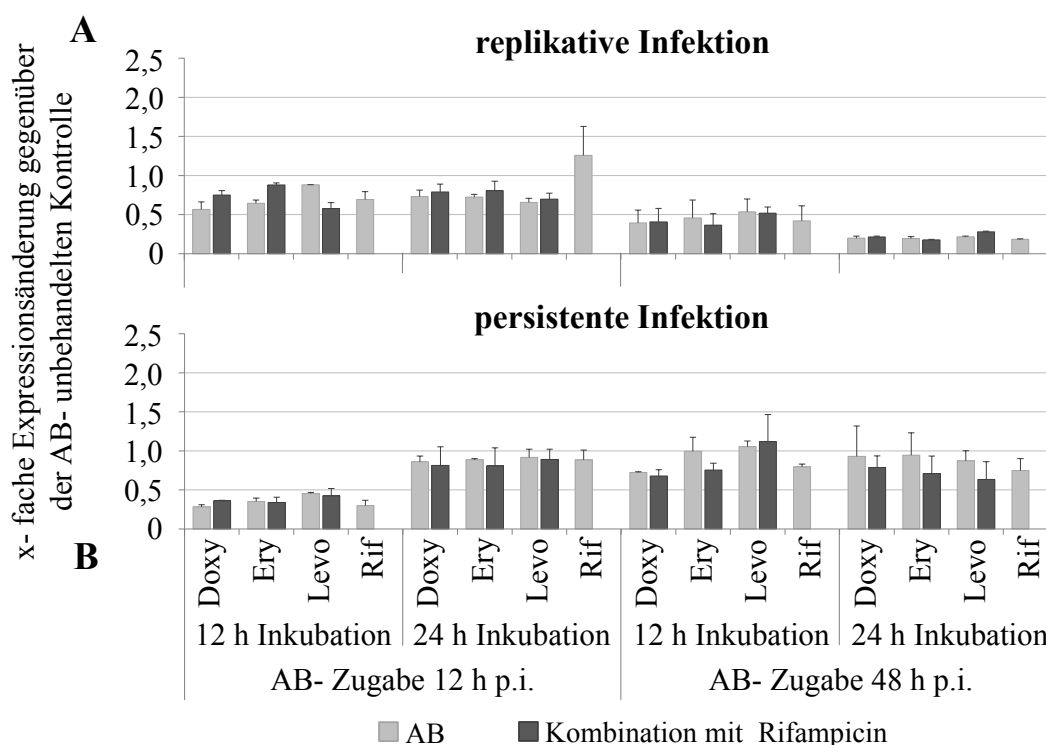


Abbildung 26: Expressionsänderung von *IL-8* nach Antibiotikabehandlung replikativer (A) bzw. persistenter (B) *C. psittaci*- Infektionen gegenüber der Antibiotika- unbehandelten Kontrolle; ± SEM; Normalisierung gegenüber *GAPDH*; n = 2; Student's T- Test; AB = Antibiotikum, Doxy = Doxycyclin, Ery = Erythromycin, Levo = Levofloxacin, Rif = Rifampicin

Die Zellen einer persistenten *C. psittaci*- Infektion reagierten bei frühzeitiger Zugabe der Antibiotika mit einer Herunterregulation der *IL-8*- Transkription um mehr als die Hälfte gegenüber der unbehandelten, infizierten Kontrolle. Jedoch stieg die Transkription nach längerer Inkubationsdauer wieder an, was auf eine mangelnde Wirksamkeit der angewendeten Antibiotika bei der Reduktion der Chlamydien hinweist (Abb. 26.B, links). Die spätere Zugabe der Antibiotika zu persistenten Infektionen hatte keine signifikante Änderung der *IL-8*- Transkription zur Folge (Abb. 26.B, rechts).

Das Gen für den TNFRSF9- Rezeptor wird nach Antibiotikabehandlung herunterreguliert

Für das Gen des TNF- Rezeptors *TNFRSF9* ergab sich ein ähnliches Muster der Transkription nach Antibiotikabehandlung wie für *IL-8* (Abb. 27).

Die Behandlung einer replikativen Infektion zum Zeitpunkt 12 h p.i. hatte keine Änderung der *TNFRSF9*- Transkription gegenüber der unbehandelten, infizierten Kontrolle zur Folge (Abb. 27.A, rechts). Dagegen führte die späte Zugabe zu einer Herunterregulierung der Transkripte um annähernd die Hälfte nach 12- stündiger Inkubation und um mehr als die Hälfte nach 24- stündiger Infektion (Abb. 27.A, links).

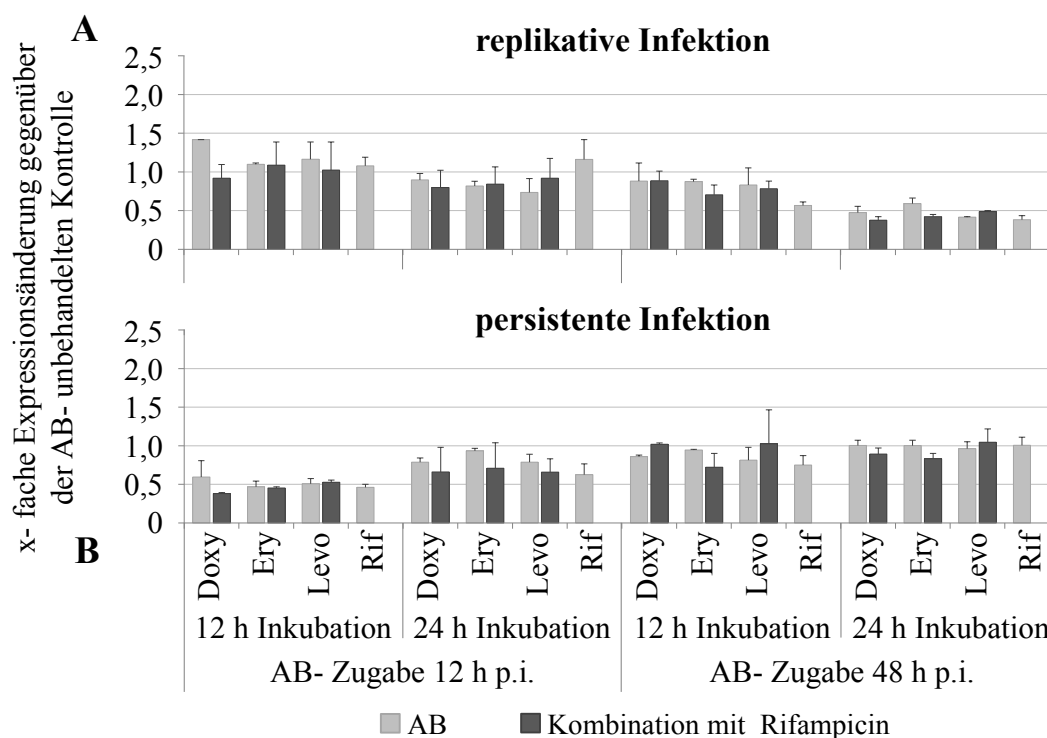


Abbildung 27: Expressionsänderung von *TNFRSF9* nach Antibiotikabehandlung replikativer (A) bzw. persistenter (B) *C. psittaci*- Infektionen gegenüber der Antibiotika-unbehandelten Kontrolle; ± SEM; Normalisierung gegenüber *GAPDH*; n = 2; Student's T- Test; AB = Antibiotikum, Doxy = Doxycyclin, Ery = Erythromycin, Levo = Levofloxacin, Rif = Rifampicin

Auch hier war bei der frühen Gabe der Antibiotika zur persistenten Infektion zunächst eine Herunterregulierung der Transkriptmengen um den Faktor 2 gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit anschließender Angleichung des Transkriptionsniveaus an das der unbehandelten Kontrolle zu beobachten (Abb. 27.B, links). Die späte Zugabe der Antibiotika verursachte dagegen keine nennenswerte Änderung der Transkriptionsaktivität von *TNFRSF9* (Abb. 27.B, rechts).

3.5 Anwendung der *in vitro*- Untersuchungen auf das Tiermodell der bovinen respiratorischen *C. psittaci*- Infektion

Ausgewählte chlamydiale Gene sowie die in Kapitel 3.4.2 *in vitro* untersuchten Wirtsgene *IL-8* und *TNFRSF9* wurden auch *in vivo* analysiert. Der Aufbau des Tierversuchs der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Reinhold (FLI Jena) sowie die Bearbeitung der Probenmaterialien wurde in Kapitel 2.2.15 bereits eingehend beschrieben. Es sollten Antibiotikatherapien untersucht werden, welche sich *in vitro* als wirksam gegen *C. psittaci*- Infektionen erwiesen haben. Jedoch wurde neben dem Makrolid Erythromycin auch Azithromycin in seiner Wirkung auf die bovine respiratorische *C. psittaci*- Infektion untersucht. Des Weiteren wurde statt des Chinolons Levofloxacin das in der Veterinärmedizin gebräuchlichere Enrofloxacin eingesetzt, dessen MIC der von Levofloxacin entspricht (Daten nicht gezeigt). In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Analyse der BALFs vorgestellt.

Für die ausgewählten chlamydialen Gene wurde die Präsenz ihrer mRNA als Ausdruck der Lebensfähigkeit der Chlamydien bestimmt. Für die Zellen der BALFs, welche sich im Wesentlichen aus neutrophilen Granulozyten zusammensetzten (LAMBERTZ 2011, PROHL *et al.* 2015c), wurde analog zu den *in vitro*- Experimenten für jede Probe die relative Expression des bovinen Zielgens im Vergleich zur *GAPDH* errechnet. Die Werte für jede mit einer Antibiotikastrategie behandelten Population und die entsprechenden Probenahmezeitpunkte wurden als Boxplot dargestellt.

3.5.1 Nachweis chlamydialer Transkripte in BALFs

Als Nachweis der Lebensfähigkeit der in den Zellen der BALFs enthaltenen *C. psittaci* wurde die Präsenz verschiedener chlamydialer Transkripte bestimmt. Die Analyse der mRNAs für *gyrA*, *ftsW* und *ompA* ergab ähnliche Verteilungsmuster für die einzelnen Behandlungsstrategien. In Abbildung 28 sind die prozentualen Anteile Transkript- positiver Tiere am jeweiligen Stichprobenumfang angegeben.

gyrA- Transkripte konnten 4 dpi noch in mindestens zwei Tieren jeder Kohorte nachgewiesen werden (Abb. 28.A). Auffällig war, dass alle mit Enrofloxacin und/ oder Rifampicin behandelten Tiere *gyrA*- Transkripte aufwiesen und auch bis zum letzten Zeitpunkt 14 dpi mindestens die Hälfte der Tiere dieser Gruppen positiv war. Generell konnten *gyrA*- Transkripte bis 14 dpi, mit Ausnahme von Azithromycin- und Erythromycin- behandelten Gruppen, in mindestens einem Tier je Behandlungsschema nachgewiesen werden.

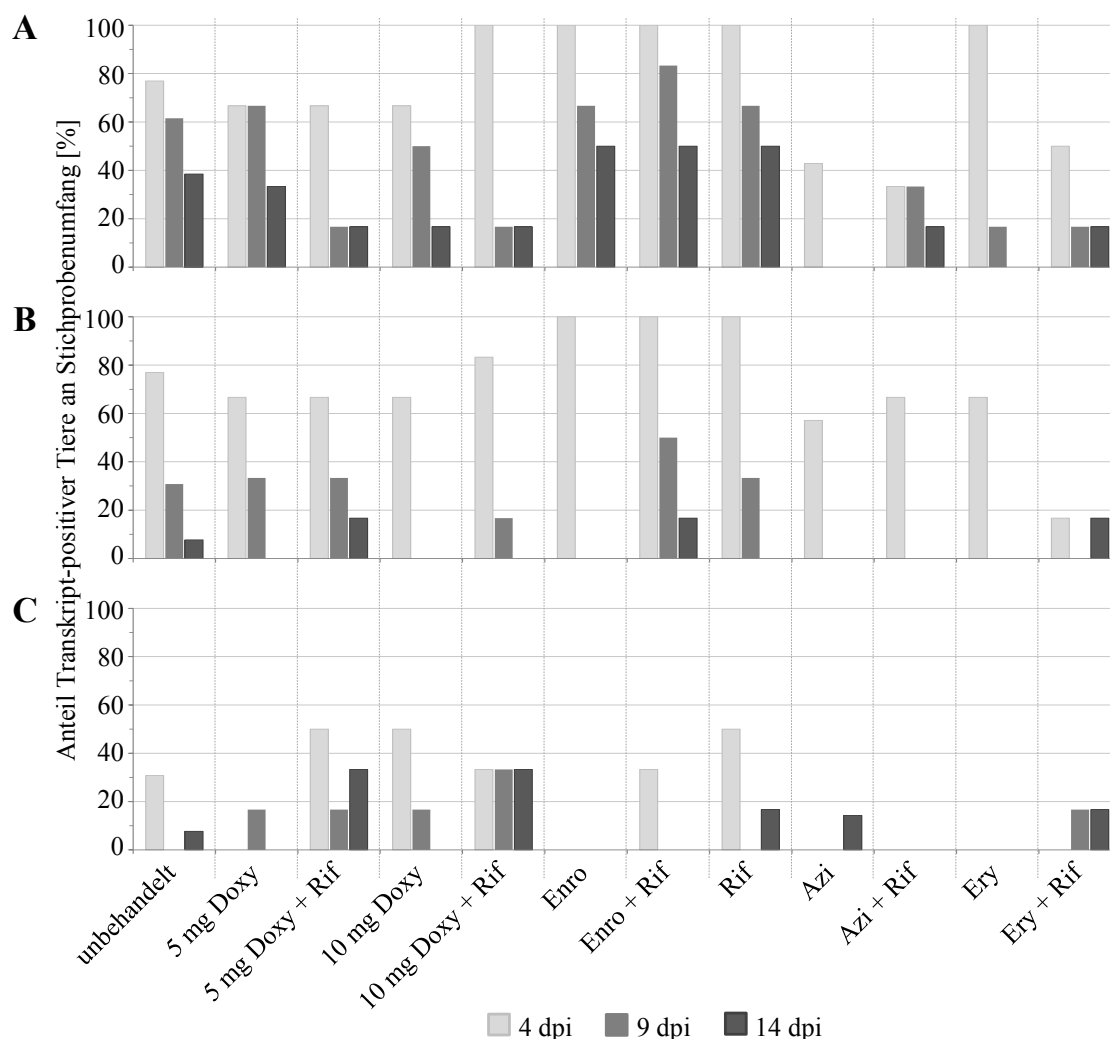


Abbildung 28: Anteil Chlamydien- mRNA- positiver BALFs nach verschiedenen Behandlungsstrategien; Anteil am jeweiligen Stichprobenumfang; zum angegebenen Zeitpunkt nach Infektion; die Präsenz von *gyrA*- (A), *ftsW*- (B) und *ompA*- Transkripten (C) wurde mittels real- time RT- PCR mit Schmelzkurvenanalyse ermittelt; n = variabel (Kapitel 2.2.15); Azi = Azithromycin, Doxy = Doxycyclin, Enro = Enrofloxacin, Ery = Erythromycin, Rif = Rifampicin; ° = Ausreißer, * = extremer Ausreißer; dpi = Tage nach Infektion

Transkripte des Zellteilungsproteins *ftsW* konnten in einer geringeren Anzahl von Tieren nachgewiesen werden als *gyrA*- Transkripte (Abb. 28.B). Auch hier waren alle Enrofloxacin- und/ oder Rifampicin- behandelten Tiere zum ersten Zeitpunkt nach Infektion positiv, während sich nach Kombinationsbehandlung mit Erythromycin und Rifampicin nur ein *ftsW*- positives Tier nachweisen ließ. Im Verlauf der Zeit nach Infektion ließen sich *ftsW*- Transkripte noch bei wenigen Tieren der unbehandelten Gruppe nachweisen. Aber auch die Gruppen, welche mit 5 mg Doxycyclin (mit/ ohne Rifampicin) oder Enrofloxacin

mit Rifampicin bzw. Rifampicin allein behandelt wurden wiesen einen gewissen Prozentsatz *ftsW*- positiver Tiere auf.

Transkripte des Gens *ompA*, welches *in vitro* unter Antibiotikaeinfluss stark differentiell reguliert wurde, konnten nur in wenigen Tieren nachgewiesen werden (Abb. 28.C). Über einen längeren Zeitraum (bis 14 dpi) konnte es vor allem in wenigen Tieren der Gruppe welche mit 5 mg bzw 10 mg Doxycyclin und Rifampicin behandelt wurde detektiert werden. Da dieses Gen im Zellkulturmodell der antibiotischen Behandlung von *C. psittaci* sehr stark herunterreguliert wurde (siehe Kapitel 3.3), könnte seine Transkription hier unter der Nachweisgrenze gelegen haben und daher mit den gegebenen Mitteln nicht zu detektieren gewesen sein.

Es konnte somit gezeigt werden, dass auch unter antibiotischer Behandlung für mehrere Tage Transkripte chlamydialer Zellteilung- und Replikation- assoziierter Gene nachweisbar waren. Dies deutet auf die Anwesenheit lebensfähiger und potentiell infektiöser Chlamydien hin.

3.5.2 *IL-8*- und *TNFRSF9*- Expression in BALFs

Die Transkription des Gens für Interleukin 8, welches eine tragende Rolle als Entzündungsmediator spielt, war zum Probenahmezeitpunkt 4 dpi in infizierten Tieren gegenüber nicht- infizierten Tieren erhöht (Abb. 29).

Diese Hochregulation fand unabhängig von einer Antibiotikatherapie statt. Im Verlauf der Zeit (9 und 14 dpi) fiel die relative Expression von *IL-8* gegenüber *GAPDH* um das bis zu Fünffache gegenüber der Transkription in nicht- infizierten Tieren ab, was auf einen negativen Feedbackmechanismus der Transkription und Translation von *IL-8* hinweisen könnte.

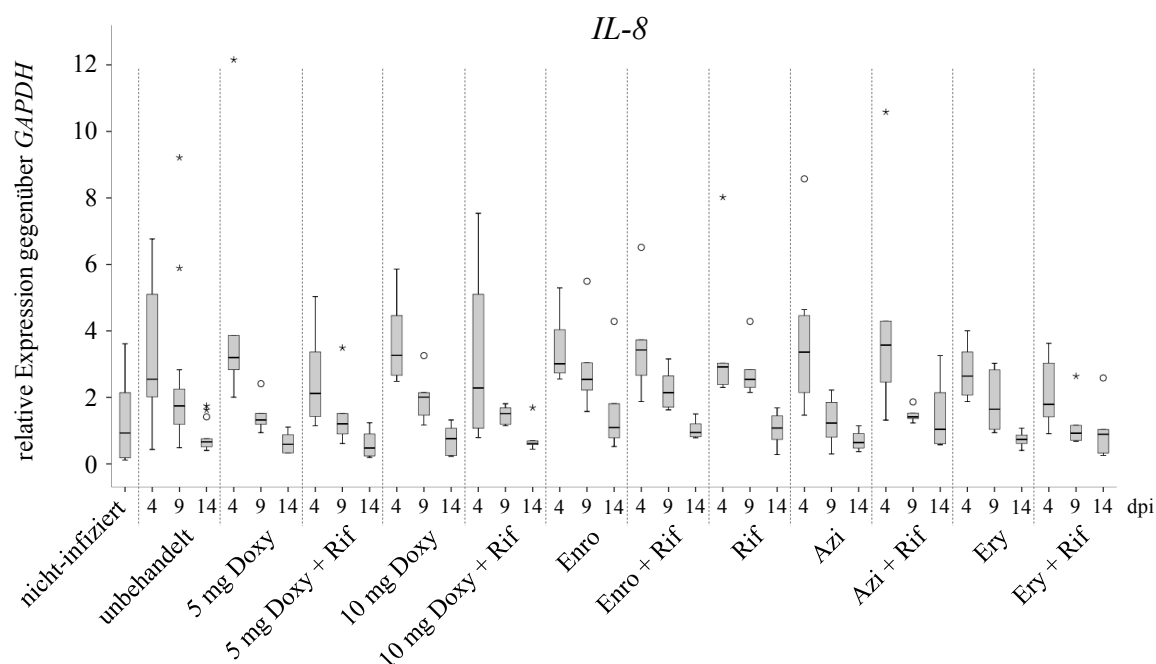


Abbildung 29: relative Expression von *IL-8* in BALF- Zellen von *C. psittaci*- infizierten Kälbern nach Behandlung mit verschiedenen Antibiotika; verschiedene Zeitpunkte nach Infektion; relative Expression in Relation zu *GAPDH*; n = variabel (Kapitel 2.2.15); Azi = Azithromycin, Doxy = Doxycyclin, Enro = Enrofloxacin, Ery = Erythro-mycin, Rif = Rifampicin; ° = Ausreißer, * = extremer Ausreißer; dpi = Tage nach Infektion

Dass die zeitabhängige *IL-8*- Transkription weitgehend unabhängig von einer Antibiotika-behandlung stattfand, könnte darauf hindeuten, dass die Kälber in der Lage waren, die durch *C. psittaci* ausgelöste akute Erkrankung ohne Beteiligung der Antibiotika auszukurieren.

Das Gen für den Tumor necrosis factor receptor superfamily member 9, welcher für die Stimulation und Proliferation aktivierter T- Zellen verantwortlich ist, wurde in infizierten Tieren im Vergleich zu nicht- infizierten Kontrolltieren heraufreguliert (Abb. 30). Die Transkription nahm im Verlauf der Zeit nach Infektion leicht zu oder blieb konstant. Jedoch waren auch hier keine nennenswerten Abhängigkeiten von einer bestimmten Antibiotikatherapie zu erkennen, was möglicherweise durch den geringen Stichprobenumfang begründet werden kann. Dies deutet ebenso wie die Transkription von *IL-8* auf eine Aktivierung der Transkription von *TNFRSF9* als Folge der Infektion hin.

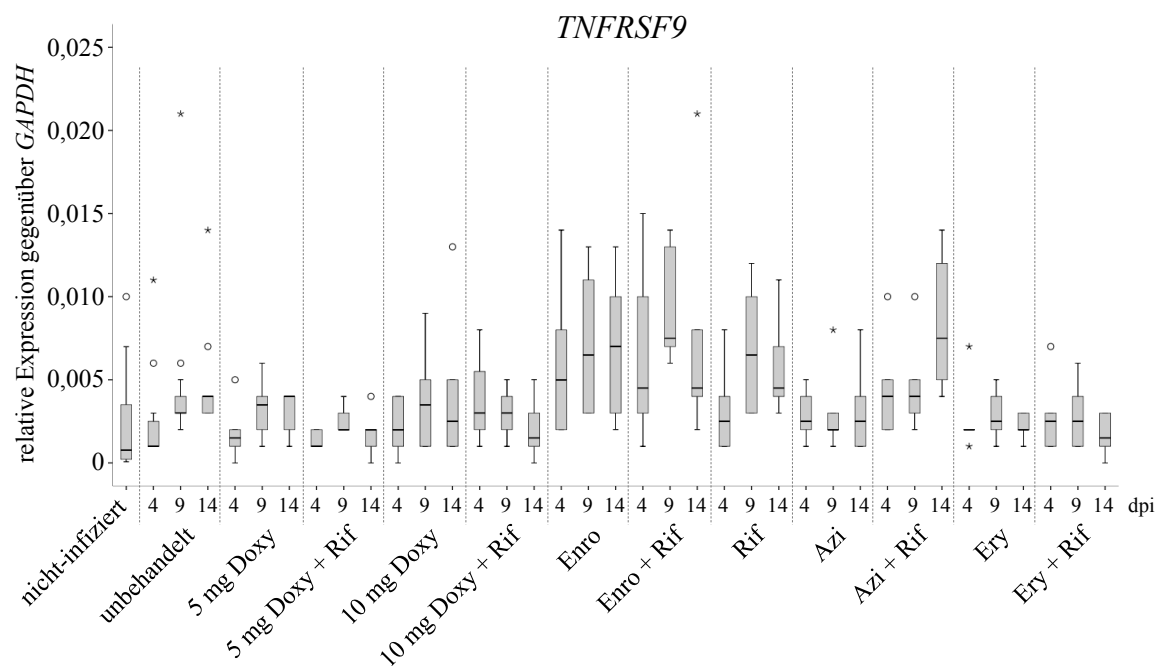


Abbildung 30: relative Expression von *TNFRSF9* in BALF- Zellen von *C. psittaci*- infizierten Kälbern nach Behandlung mit verschiedenen Antibiotika; verschiedene Zeitpunkte nach Infektion; relative Expression in Relation zu *GAPDH*; n = variabel (Kapitel 2.2.15); Azi = Azithromycin, Doxy = Doxycyclin, Enro = Enrofloxacin, Ery = Erythromycin, Rif = Rifampicin; ° = Ausreißer, * = extremer Ausreißer; dpi = Tage nach Infektion

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand eines IFN γ -vermittelten Persistenzmodells für *C. psittaci* in epithelialen A549- Zellen gezeigt werden, dass persistente Chlamydien weniger sensitiv auf eine antibiotische Behandlung ansprechen als replikative Chlamydien. Auch die Veränderung der Transkription ausgewählter chlamydialer Gene spiegelte die geringere Wirksamkeit der Antibiotika gegenüber persistenten *C. psittaci* wider. Dabei waren das Antibiotikum Levofloxacin und Kombinationen mit Rifampicin am wirksamsten bei der Reduktion wiederanzüchtbarer Chlamydien.

Anhand des Modells wurden einige Wirtszellgene identifiziert, welche während der replikativen und persistenten Infektion hochreguliert waren. Diese Gene, welche mit Entzündungsprozessen des Wirtsorganismus assoziiert sind, wurden unter antibiotischer Behandlung von *C. psittaci*- infizierten Zellen herunterreguliert. In der replikativen Infektion wurden die Gene stärker reguliert.

Die *in vitro* erarbeiteten Methoden und erzielten Erkenntnisse bezüglich wirksamer Behandlungsstrategien wurden auf ein Tiermodell der bovinen respiratorischen *C. psittaci*-Infektion übertragen. Hier konnte in Zellen der bronchoalveolären Lavage eine zeitabhängige Reduktion chlamydialer Transkriptionsaktivität nachgewiesen werden und ebenso eine differentielle, zeitabhängige Transkription der Wirtsgene *IL-8* und *TNFRSF9*.

4.1 *Chlamydia psittaci* lässt sich mittels IFN γ *in vitro* in das Stadium der Persistenz versetzen und zeigt sowohl eine verringerte Replikation als auch Veränderungen der Expression verschiedener Gene

4.1.1 Etablierung des IFN γ -vermittelten Persistenzmodells

Chlamydien besitzen einen einzigartigen biphasischen Entwicklungszyklus, welcher sich aus einer intra- und einer extrazellulären Form zusammensetzt. Der normale Ablauf eines Entwicklungszyklus ist abhängig von den Bedingungen inner- und außerhalb der Wirtszelle. Durch Mangel an Nährstoffen und Aminosäuren, aber auch durch Stressstimuli wie Wirtszytokine oder Antibiotika kann der normale Entwicklungszyklus angehalten werden und die Chlamydien gehen in das Stadium der Persistenz über (HOGAN *et al.* 2004). Chlamydiale Persistenz *in vitro* wird definiert als lebensfähige aber nicht- kultivierbare Chlamydien, welche sich als morphologisch aberrante, vergrößerte und nicht teilungsfähige Körperchen darstellen (BEATTY *et al.* 1994d).

In dieser Arbeit wurde das IFN γ -vermittelte Persistenzmodell angewendet, dessen Mechanismen bereits gut charakterisiert sind. In den 1980er Jahren konnte gezeigt werden, dass IFN γ die Komponente aus Überständen stimulierter T-Zellen darstellt, welche das Wachstum von Chlamydien inhibierte und zu abnormalen chlamydialen Formen führte (BYRNE and KRUEGER 1983, ROTHERMEL *et al.* 1983, BYRNE *et al.* 1986). Der Mechanismus der Persistenzinduktion wurde durch Byrne und Kollegen vorgestellt. Dieser beruht auf der IFN γ -vermittelten Aktivierung des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), welches die Degradation der Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin katalysiert. Dadurch entsteht ein Mangel dieser für Chlamydien essentiellen Aminosäure, welcher die Bildung aberranter Formen und die Einstellung der Replikation induziert. Die Persistenzinduktion kann jedoch durch Zugabe exogenem Tryptophans aufgehoben werden (BYRNE *et al.* 1986).

Neben dem Potential *in vitro* die chlamydiale Persistenz induzieren zu können, könnte IFN γ auch *in vivo* bei der Entstehung von chronischen Chlamydieninfektionen eine erhebliche Rolle spielen (REVENEAU *et al.* 2005). Da es einen wichtigen Mediator der T-Zell-vermittelten Immunantwort gegen chlamydiale Infektionen darstellt, liegt die Annahme nahe, dass es auch *in vivo* zur Entstehung aberranter, nicht-replikativer chlamydialer Körper beiträgt (LOOMIS and STARNBACH 2002, MORRISON and CALDWELL 2002). Diese chronischen Infektionen sind gegenüber einer antibiotischen Therapie widerstandsfähiger als akute Chlamydieninfektionen (HAMMERSCHLAG 2002). Daher wurde dieses Modell in der vorliegenden Arbeit angewendet, um verschiedene antibiotische Behandlungsstrategien gegenüber persistenten *C. psittaci* zu testen.

Neben dem sehr wahrscheinlichen Beitrag zur chronischen Infektion *in vivo* bietet das IFN γ -vermittelte Persistenzmodell gegenüber Antibiotika-vermittelten Modellen den Vorteil, dass der Einfluss einer antibiotischen Therapie untersucht werden kann, ohne direkte Wechselwirkungen zwischen Persistenzstimulus und Antibiotikum hervorzurufen.

Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass Epithelzellen durch rekombinantes IFN γ stimuliert werden können, das Wachstum von *C. psittaci* zu inhibieren (BYRNE *et al.* 1986, GOELLNER *et al.* 2006). Die Gruppe um Göllner legte zudem eine umfassende Arbeit zur Analyse der differentiellen Transkription verschiedener chlamydialer Gene in der IFN γ -vermittelten Persistenz vor, welche in laryngopharyngealen Epithelzellen durchgeführt wurde (GOELLNER *et al.* 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde das IFN γ -vermittelte Persistenzmodell in einer Alveolarepithel-Zelllinie etabliert. Diese Zellen stellen *in vivo* den primären Infektionsort für intra-

zelluläre respiratorische Erreger dar. Die hier verwendete A549- Zelllinie wurde 1972 etabliert (GIARD *et al.* 1973) und den Typ II alveolären epithelialen Zellen zugeordnet (LIEBER *et al.* 1976). *In vivo* kleiden Zellen dieses Typs gemeinsam mit den Alveolarzellen Typ I die Alveolen aus und sind für die Synthese und Sekretion komplexer Lipoproteine verantwortlich, welche als Surfactant die Alveolarepithelien überziehen und somit die Oberflächenspannung der Lungenbläschen herabsetzen. Für diese Zelllinie konnte bewiesen werden, dass sie in der Lage ist, nach IFN γ - Stimulation Tryptophan zu degradieren (WERNER-FELMAYER *et al.* 1989). Sie kann ebenso auf die Infektion mit *C. pneumoniae* durch die IFN γ -, IL-8- und TNF α - Antwort reagieren (YANG *et al.* 2003).

Die Etablierung des IFN γ - induzierten Persistenzmodells orientierte sich an den Arbeiten von Byrne und Göllner. Diese Arbeiten, aber auch die Gruppe um Summersgill zeigten, dass die Behandlung von Zellen vor und nach Infektion mit einer hohen Konzentration IFN γ zur Etablierung der Persistenz notwendig war (BYRNE *et al.* 1986, SUMMERSGILL *et al.* 1995, GOELLNER *et al.* 2006), während für die Etablierung der Persistenz von *C. trachomatis* i.d.R. niedrigere IFN γ - Konzentrationen benötigt werden (BELLAND *et al.* 2003, RODEL *et al.* 2012). Die von Byrne und Kollegen beschriebene Reduktion der chlamydialen Inklusionen wurde in der vorliegenden Arbeit ebenso beobachtet wie die von Göllner und Kollegen bestimmte Verringerung der Anzahl rekultivierbarer Chlamydien (BYRNE *et al.* 1986, GOELLNER *et al.* 2006). Beide Parameter wurden als Burst Size zueinander in Bezug gestellt und als die Persistenz- definierende Größe betrachtet. Die in dieser Arbeit ermittelte IFN γ - Konzentration von 200 U/ ml, welche für die Reduktion der Burst Size um 85 % notwendig war, liegt im Bereich dessen, was durch die Gruppen um Byrne bzw. Göllner berichtet wurde (BYRNE *et al.* 1986, GOELLNER *et al.* 2006). Eine Erhöhung der Konzentration führte zu keiner weiteren Verringerung von Inklusionen und rekultivierbaren Chlamydien und widerspricht damit den Beobachtungen von Shemer und Sarov, welche zeigten, dass sich mit Erhöhung der IFN γ - Konzentration die Bildung neuer infektiöser Chlamydien vollständig inhibieren ließ (SHEMER and SAROV 1985).

Auch im Langzeitversuch ließ sich keine vollständige Inhibierung der Wiederanzüchtbarkeit erreichen. Des Weiteren zeigten LSM- Aufnahmen nicht nur die teilweise Inhibierung der Bildung von Inklusionen in IFN γ - behandelten Zellen, sondern auch verkleinerte, fragmentierte Inklusionen, wie sie für alle Persistenzmodelle typisch sind (HOGAN *et al.* 2004). Die verringerte Anzahl chlamydialer Inklusionen nach IFN γ -Behandlung könnte

durch die Verringerung des intrazellulären Tryptophanpools vor der Infektion verursacht worden sein. Dadurch stand diese essentielle Aminosäure nicht in ausreichender Menge für die *de novo* Proteinsynthese zur Verfügung, welche zur Differenzierung von EBs zu RBs benötigt wird (SCIDMORE *et al.* 1996).

Die Langzeitbeobachtung der persistenten *C. psittaci*- Infektion war geprägt von weiteren typischen Charakteristika wie der Reduktion der infektiösen, wiederanzüchtbaren Partikel im Vergleich zur replikativen Infektion über den gesamten Zeitraum (SCHOBORG 2011). Eine leichte Zunahme der rekultivierbaren Chlamydien 36 Stunden nach Infektion könnte der unvollständigen Inhibierung der Bildung infektiöser Partikel zuzuschreiben sein. Allerdings blieb hier eine Reinfektion nicht- infizierter Zellen, wie sie für die replikative Infektion gezeigt wurde, weitestgehend aus. Daher blieb die Zahl der Inklusionen in der persistenten Infektion nahezu konstant, während sie in der replikativen Infektion während des Beobachtungszeitraums um das Zehnfache zunahm. Diese Beobachtungen sind übereinstimmend mit denen, welche für *C. pneumoniae* beschrieben wurden (MANNONEN *et al.* 2004). Auch Inklusionen der replikativen Infektion wiesen typische Merkmale auf. Sie füllten teilweise das komplette Wirtszellzytosol aus und umschlossen den Zellkern. Zu späteren Zeitpunkten konnte eine heterogene Zusammensetzung der Inklusionen, bestehend aus jungen, aus Reinfektionen stammenden, und reifen Inklusionen, welche ihre EBs teilweise freigesetzt hatten, beobachtet werden. Zum letzten Zeitpunkt des Beobachtungszeitraums war nahezu jede Zelle infiziert.

Ein weiteres Merkmal persistenter Chlamydien ist deren Lebensfähigkeit (HOGAN *et al.* 2004). Diese lässt sich zum einen durch die Reaktivierung persistenter Chlamydien nach Entzug des Persistenzstimulus und zum anderen durch den Nachweis einer bestehenden Transkriptionsaktivität belegen (SCHOBORG 2011). Das Potential persistenter *C. psittaci*, nach Entzug des IFN γ das Wachstum und die Replikation wieder aufzunehmen und rekultivierbare EBs zu bilden wurde über einen längeren Zeitraum hinweg gezeigt. Der Entzug von IFN γ und Zugabe von frischem Medium führte zu einer deutlichen Zunahme rekultivierbarer *C. psittaci*. Jedoch zeigte sich eine Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation mit IFN γ , wobei die Reaktivierung nach kurzer Inkubationsdauer ausblieb. Dies impliziert eine zeitverzögerte Wirkung von IFN γ und IDO, welche nach der kurzen Inkubationsdauer noch aktiv ist und das, mit dem frischen Medium supplementierte, Tryptophan degradiert. Dagegen war nach 96- stündiger Inkubation die Aktivität der IDO inhibiert, was die Reaktivierung der Chlamydien durch Mediumwechsel ermöglichte.

4.1.2 Chlamydiale Transkriptionsaktivität von replikativer im Vergleich zu persistenter *C. psittaci*- Infektion

Die Untersuchung der Transkription und die vergleichende Analyse verschiedener chlamydialer Gene während Persistenz und replikativem Entwicklungszyklus erfolgte mittels real-time RT-PCR zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion. Ziel dieser Untersuchungen war es, chlamydiale Gene zu identifizieren, welche im IFN γ -vermittelten Persistenzmodell gegenüber der replikativen Infektion differentiell reguliert sind. Deren Verhalten sollte in weiteren Versuchen unter Antibiotikaeinfluss analysiert werden um mögliche Kandidatengene für das Monitoring der Antibiotikatherapie einer persistenten Chlamydieninfektion *in vivo* definieren zu können.

Für die *in vitro*-Analysen musste zunächst ein geeignetes Verfahren zur Normalisierung der Daten gefunden werden. Wie aus der Literatur hervorgeht, ist es nahezu unmöglich, ein chlamydiales *house-keeping*-Gen zu finden, welches unter allen Umständen (u.a. Tryptophanmangel, Antibiotika-Behandlung) und während des gesamten Entwicklungszyklus konstant exprimiert wird. So zeigten die Gruppen um Ouellette bzw. Göllner, dass die oft als *house-keeping*-Gene verwendeten *16S rRNA* und *gyrA* als solche ungeeignet sind, da auch sie differentiell transkribiert werden (OUELLETTE *et al.* 2005, GOELLNER *et al.* 2006). Engström und Kollegen bewiesen 2010, dass die differentielle Expression chlamydialer Gene abhängig vom Referenzgen variiert und, dass einige Transkripte nach Behandlung mit Rifampicin nicht mehr nachweisbar waren. Daher plädierten sie für die genomische DNA als Referenz zum Normalisieren, da sie zum einen wesentlich stabiler ist und zum anderen die Anzahl der Chlamydien reflektiert (ENGSTROM *et al.* 2010). Entgegen der allgemeinen Ansicht, dass persistente Chlamydien weiterhin ihre DNA replizieren und Chromosomen akkumulieren (HAMMERSCHLAG *et al.* 1992a, HOGAN *et al.* 2004), konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass im IFN γ -vermittelten Persistenzmodell für *C. psittaci* in A549-Zellen nur eine geringfügige Akkumulierung der chromosomalen DNA im Zeitverlauf stattfand. Dadurch wird die Generierung verfälschter Ergebnisse vermieden, die aufgrund einer hohen Chromosomenreplikation eine sehr geringe Transkriptionsrate für verschiedene Gene angeben. Im Gegenzug dazu nahmen die relativen Genomäquivalente in der replikativen Infektion stetig zu und reflektierten damit die Zunahme der Inklusionen bzw. rekultivierbaren Bakterien. Ein vergleichbares Verhalten wurde für *C. pneumoniae* beschrieben (SLEPENKIN *et al.* 2003, MANNONEN *et al.* 2004, OUELLETTE *et al.* 2006).

Anhand der Literatur wurden einige Gene ausgewählt, von denen gezeigt wurde, dass sie während der IFN γ -vermittelten Persistenz hochreguliert werden (MOLESTINA *et al.* 2002, GOELLNER *et al.* 2006). Zu diesem Persistenzmodell in *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* gibt es eine Reihe von Publikationen. Die molekulargenetischen Eigenschaften von *C. psittaci* in der IFN γ -vermittelten Persistenz wurden jedoch bisher nur von der Gruppe um Göllner beschrieben (GOELLNER *et al.* 2006). Daher wird vor allem diese Arbeit zur Diskussion der eigenen Ergebnisse herangezogen. Aber auch die Arbeiten, welche sich mit *C. pneumoniae* befassen, werden berücksichtigt, da diese Spezies *C. psittaci* sowohl im Stammbaum nähersteht als *C. trachomatis*, als auch den gleichen Gewebetropismus aufweist und zum Teil ähnliche Krankheitsbilder auslöst (HORN 2011). Beiden Spezies fehlt zudem das Trp-Operon, wodurch sie nicht in der Lage sind, Tryptophan aus Vorstufen zu synthetisieren und somit die IFN γ -vermittelte Degradation dieser essentiellen Aminosäure zu umgehen (SCHOFEL *et al.* 2011). *C. trachomatis* hingegen besitzt, in Abhängigkeit des Serovars und Gewebetropismus, einige oder alle Komponenten dieses Operons, was diese Spezies unter Umständen in anderer Weise auf die IFN γ -induzierte Persistenz reagieren lässt (FEHLNER-GARDINER *et al.* 2002, CALDWELL *et al.* 2003). Die hier zitierten Arbeiten bzgl. der differentiellen Genexpression in IFN γ -vermittelter Persistenz von *C. psittaci* und *C. pneumoniae* wurden ausnahmslos in der laryngealen Epithelzelllinie HEp2 durchgeführt. Des Weiteren unterschieden sich die Modelle in der eingesetzten Infektionsdosis, Konzentration und Zugabezeitpunkt von IFN γ und der Methode, mit der die Daten generiert und normalisiert wurden. Außerdem wurde für die Persistenzinduktion von *C. pneumoniae* keine Vorinkubation mit IFN γ benötigt (BYRNE *et al.* 2001, MATHEWS *et al.* 2001, MOLESTINA *et al.* 2002, SLEPENKIN *et al.* 2003, GOELLNER *et al.* 2006, MUKHOPADHYAY *et al.* 2006, OUELLETTE *et al.* 2006, POLKINGHORNE *et al.* 2006, KLOS *et al.* 2009, TIMMS *et al.* 2009).

In der persistenten gegenüber der replikativen Infektion waren die Gene *16S rRNA* und *rpoA*, deren Produkte für die Initiation der chlamydialen Proteinbiosynthese benötigt werden, hochreguliert. Diese Beobachtungen entsprechen damit den durch Ouellette und Kollegen vorgestellten Ergebnissen für *C. pneumoniae*, welche ebenfalls gegen chlamydiale genomische DNA normalisiert wurden (OUELLETTE *et al.* 2006). Eine mögliche Erklärung für die Hochregulation dieser Gene in der persistenten Infektion könnte eine generelle Zunahme der chlamydialen Transkriptions- und Translationsaktivität sein um den IFN γ -induzierten Tryptophanmangel zu kompensieren.

Das Gen *ompA*, welches für das chlamydiale MOMP codiert, war in der persistenten gegenüber der replikativen Infektion hochreguliert, was die Ergebnisse verschiedener Gruppen für *C. psittaci* und *C. pneumoniae* bestätigt (MATHEWS *et al.* 2001, MOLESTINA *et al.* 2002, GOELLNER *et al.* 2006, MUKHOPADHYAY *et al.* 2006). Frühe Studien zeigten während der Persistenz eine Zunahme des Stressproteins Hsp60 während das Membranprotein MOMP im Vergleich zur replikativen Infektion abnahm (BEATTY *et al.* 1994c). Die Verringerung des MOMP:Hsp60- Verhältnis (bzw. das Verhältnis der Gene *ompA:groEL*) galt lange Zeit als universeller Marker für chlamydiale Persistenz. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Während die Transkription von *ompA* in der Persistenz aktiviert wurde, blieb die Transkription von *groEL* in der persistenten Infektion unverändert gegenüber der replikativen Infektion. Die Hochregulierung von *ompA* könnte darin begründet sein, dass die aberranten chlamydialen Körper, welche in der Differenzierung zu EBs inhibiert sind, die benötigten Transkripte bereithalten, um sofort nach Entzug des Persistenzstimulus in die reproduktive Phase und die Differenzierung zu EB eintreten zu können. Dafür würde auch die hier beobachtete ausbleibende Herunterregulierung des Gens für das Zellteilungsprotein FtsW sprechen, welche von verschiedenen Autoren gezeigt wurde (BYRNE *et al.* 2001, GOELLNER *et al.* 2006, KLOS *et al.* 2009). FtsW ist ein Protein, welches für die Septenbildung bei der bakteriellen Zellteilung benötigt wird (DONACHIE 1993).

Die Analyse von drei chlamydialen Genen, welche in das Wirtszellzytosol sezerniert werden, ergab unterschiedliche Expressionsmuster. Das Gen *cpaf* für den chlamydial protease- like activity factor, welcher eine zentrale Rolle bei der Inhibition der Wirtszellapoptose spielen soll (ZHONG 2011), wurde in dieser Arbeit nicht differentiell reguliert, was den Beobachtungen von Göllner und Kollegen widerspricht (GOELLNER *et al.* 2006). Auch die Transkription von *cHtrA*, welches für eine Protease codiert, die u.a. die Degradation chlamydialer Proteine vermittelt (TIMMS *et al.* 2009, ZHONG 2011), wurde nicht differentiell reguliert und entspricht somit nicht den Ergebnissen der Gruppen von Mukhopadhyay bzw. Timms (MUKHOPADHYAY *et al.* 2006, TIMMS *et al.* 2009). Im Gegenzug zu der ausbleibenden differentiellen Regulation von *cpaf* und *cHtrA* wurde die Transkription von *Tsp* in der persistenten Infektion im Vergleich zur replikativen Infektion leicht herunterreguliert. Dieses Gen codiert ebenfalls eine chlamydiale Protease (ZHONG 2011), für die eine inhibitorische Wirkung auf den NF- κ B- Signalweg der Zelle beschrieben wurde (LAD *et al.* 2007).

Des Weiteren war das Gen *sctN*, welches eine TTSS-assozierte ATPase codiert (BEECKMAN *et al.* 2008), nach IFN γ -Behandlung leicht herunterreguliert, während die Gruppe um Molestina mittels Proteomics-Studien zeigte, dass dieses Protein in *C. pneumoniae* nach IFN γ -Stimulation verstärkt exprimiert wurde (MOLESTINA *et al.* 2002). Eine Herunterregulierung dieses Gens könnte zu einer verringerten Sekretion chlamydialer Effektorproteine in das Wirtzytosol führen.

Gene, welche mit dem chlamydialen Metabolismus assoziiert sind (*glgP*, *amn*, *pgk*), waren in der persistenten gegenüber der replikativen Infektion nicht differentiell reguliert.

Die vorliegende Arbeit hat, ebenso wie eine Vielzahl anderer Publikationen, bestätigt, dass kein einheitliches Genexpressionsmuster während der IFN γ -vermittelten Persistenz von Chlamydien existiert. Auch das Beibehalten von Zellkulturbedingungen und Analysemethoden und die Variation des Persistenzstimulus zeigte, dass für die chlamydiale Persistenz kein übereinstimmendes Genexpressionsmuster existiert (GOELLNER *et al.* 2006, MUKHOPADHYAY *et al.* 2006, KLOS *et al.* 2009, TIMMS *et al.* 2009).

4.2 Replikative *Chlamydia psittaci* werden durch Antibiotika effizienter inhibiert als persistente Chlamydien und spiegeln dies auch in ihrer Genexpression wider

Akute Chlamydieninfektionen lassen sich in der Regel durch eine adäquate antimikrobielle Therapie gut eradizieren. Hierbei stellen Tetrazykline, Makrolide und Chinolone die Antibiotika der Wahl dar (SENN *et al.* 2005).

Die Behandlung einer Chlamydieninfektion wird erschwert, wenn der Erreger durch eine insuffiziente Antibiotikatherapie und/ oder Immunfaktoren des Erkrankten in ein chronisch-persistentes Stadium übergeht. Dadurch entgeht er zum einen seiner Detektion beziehungsweise wird aufgrund fehlender Symptomatik nicht nach ihm gesucht. Zum anderen ist er wesentlich widerstandsfähiger gegenüber einer antimikrobiellen Therapie. Lösen sich die persistenzinduzierenden Stressstimuli auf, kann es zu einem Wiederkehren der Infektion kommen und die vorangegangene Therapie gilt als nicht erfolgreich. Dies wurde zum Beispiel für genitale *C. trachomatis*-Infektionen beschrieben, welche trotz Antibiotikatherapie wiederkehrten (DEAN *et al.* 2000, SMITH *et al.* 2001, WHITTINGTON *et al.* 2001). Durch wiederkehrende Infektionen kann der Wirtsorganismus durch inflammatorische Prozesse mehr und mehr beeinflusst werden, bis es zu irreparablen Schädigungen kommt. Daher ist es unerlässlich, die Detektionsmethoden anzupassen, um auch nicht-kultivierbare, aber lebensfähige persistente Chlamydien nachweisen zu können. Außerdem müssen alternative Strategien der antimikrobiellen Therapie gefunden werden, welche

ebenso in der Lage sind, weniger empfindliche persistente Chlamydien zu erfassen und zu eradizieren.

Als vielversprechender therapeutischer Ansatz hat sich die Anwendung von Rifampicin in Kombination erwiesen, welches sowohl bei der erfolgreichen Therapie einer durch *C. psittaci* verursachten Endokarditis eingesetzt wurde (JARIWALLA *et al.* 1980) als auch zur Verbesserung der Symptome von durch *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* verursachter reaktiver Arthritis (CARTER *et al.* 2010).

4.2.1 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration verschiedener Antibiotika gegenüber replikativen *C. psittaci*

Die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MIC) eines Antibiotikums stellt eine Möglichkeit dar, die Empfindlichkeiten von Bakterien gegenüber den getesteten Antibiotika zu charakterisieren und somit eine Aussage über mögliche Therapieerfolge und Antibiotikaresistenzen treffen zu können. In der klassischen, zellkulturunabhängigen Mikrobiologie werden Resistenzbestimmungen durch Mikrodilutionsverfahren oder Agardiffusionstests ausgeführt. Bei der Analyse der Empfindlichkeiten von Chlamydien gegenüber Antibiotika ist man jedoch aufgrund ihres intrazellulären Entwicklungszyklus zwingend auf den Einsatz von Zellkulturen angewiesen. Dies hat zur Folge, dass eine Vielzahl von teilweise sehr unterschiedlichen Modellen zur Bestimmung der antimikrobiellen Empfindlichkeit publiziert wurde (SUCHLAND *et al.* 2003, WANG *et al.* 2005). Auch die Definition der MIC wird u.U. abweichend benutzt oder, vor allem bei der Testung von Patientenisolaten, als MIC₅₀ bzw. MIC₉₀ (50 bzw 90 % der Isolate weisen keine Inklusionen mehr auf) angegeben.

Die in dieser Arbeit verwendete Definition der MIC wurde von Dreses- Werringloer und Kollegen übernommen. Darin stellt die MIC diejenige Antibiotikakonzentration dar, welche die Bildung chlamydialer Inklusionen verhindert. Allerdings wurden die Antibiotika, abweichend zur genannten Publikation, bereits direkt nach Infektion zugegeben (DRESES-WERRINGLOER *et al.* 2000).

Die hierbei generierten Werten für die MICs verschiedener Antibiotika sind im Wesentlichen vergleichbar zu denen, welche in der Literatur für verschiedene *C. psittaci*- Stämme beschrieben wurden (TRIBBY *et al.* 1973, HIRAI and UNE 1986, KIMURA *et al.* 1993, NIKI *et al.* 1994, BUTAYE *et al.* 1997, MIYASHITA *et al.* 1997, DONATI *et al.* 1998, DONATI *et al.* 2002, SWOBODA *et al.* 2003). Ähnliche Werte wurden auch für die anderen human- medizinisch relevanten Chlamydienspezies *C. trachomatis* und *C. pneu-*

moniae ermittelt (RIDGWAY *et al.* 1978, HAMMERSCHLAG *et al.* 1992b, GIEFFERS *et al.* 1998, SUCHLAND *et al.* 2003, DONATI *et al.* 2010).

Wie sich an den in dieser Arbeit ermittelten MICs erkennen lässt, besitzen die einzelnen Vertreter innerhalb einer Wirkstoffgruppe die gleiche MIC gegenüber Chlamydien. Doch auch die Antibiotikaklassen, welche als Transkriptions- (Rifampicin) oder Translationshemmer (Doxycyclin, Makrolide) mit der bakteriellen Proteinbiosynthese interferieren grenzen sich bzgl. der Höhe ihrer MIC von den Inhibitoren der bakteriellen Gyrase A (Chinolone) ab. So wiesen die Transkriptions- bzw. Translationshemmer eine geringere MIC auf als die Gyrase A- Hemmer. Die frühzeitige Zugabe geringer Mengen Transkriptions- und Translationshemmer könnte die *de novo* Synthese von RNA und Proteinen inhibieren, welche für die Differenzierung von EB zu RB und den Start der intrazellulären Entwicklung notwendig sind (SCIDMORE *et al.* 1996). Dagegen hatte die frühe Zugabe äquivalenter Mengen von Gyrase A- Inhibitoren keine Wirkung auf die Differenzierung von EB zu RB und die chlamydiale Proteinsynthese, wie es auch durch die Gruppe um Siewert angedeutet wurde (SIEWERT *et al.* 2005). Somit konnte der erste Schritt der intrazellulären Entwicklung trotz Chinolon- Behandlung vollzogen werden und es bildete sich eine kleine Inklusion. Im weiteren Verlauf wurde jedoch die Replikation der Chlamydien durch Binärsplaltung und damit das Inklusionswachstum inhibiert. Erst in höheren Konzentrationen wirkten Gyrase A- Hemmer bakterizid, d.h. es fand keine Differenzierung von EB zu RB statt und die Bildung einer kleinen Inklusion blieb, wie bei der Anwendung von Transkriptions- und Translationshemmern, aus. Der Unterschied ist jedoch, dass die Wirkung von Doxycyclin, Makroliden und Rifampicin wenn sie in der MIC angewendet werden bakteriostatisch ist, während die MIC der Chinolone bakterizid wirkt. So zeigten Donati und Kollegen, dass die MIC von Levofloxacin gleichzeitig der Minimalen Bakteriziden Konzentration (MBC) entsprach, während die MBC für Doxycyclin gegenüber der MIC vier- bis achtmal erhöht war (DONATI *et al.* 1998).

Ein weiterer Einflussfaktor auf die MIC eines Antibiotikums gegen Chlamydien ist dessen intrazelluläre Verfügbarkeit. Da Chlamydien obligat intrazelluläre Pathogene sind, muss das jeweilige Antibiotikum nicht nur die Zellwand des Bakteriums passieren können, sondern auch die Wirtszellmembran sowie deren Derivat, die Inklusionsmembran, durchdringen. Auch der Aktionsort in einer Vakuole oder einem Phago(lyso)som kann die Aktivität von Antibiotika negativ beeinflussen (MAURIN *et al.* 1992, VAN BAMBEKE and TULKENS 2001). Somit lässt sich von der oben definierten MIC nicht automatisch auf die intrazellulär wirksamen Konzentrationen des jeweiligen Antibiotikums schließen. Die hier

bestimmten „extrazellulären MICs“ sind jedoch geringer als die Antibiotikakonzentrationen, welche unter einer Antibiotikatherapie *in vivo* im Serum erreicht werden. Die Serumkonzentration von Doxycyclin kann die hier bestimmte MIC um das mehr als 25- fache überschreiten, während aufgrund der guten Gewebegängigkeit in der Lunge noch höhere Konzentrationen nachgewiesen werden konnten (HARTNETT and MARLIN 1976). Auch Erythromycin konnte in der bis zu 400- fachen Konzentration der MIC im Serum nachgewiesen werden (MATHER *et al.* 1981), wobei eine starke Penetration in die Gewebe und auch eine höhere intra- als extrazelluläre Konzentration gezeigt werden konnte (MARTIN *et al.* 1985). Die Levofloxacin- Konzentration, welche im Serum erreicht wird, übersteigt die hier bestimmte MIC um ein Sechsfaches, wobei auch hier höhere Konzentrationen im Lungengewebe nachgewiesen werden konnten (ANDREWS *et al.* 1997, LEE *et al.* 1998). Rifampicin ließ sich in Serum und Gewebe in der etwa 600- fachen Konzentration der MIC nachweisen. Des Weiteren kann es seine antibakterielle Aktivität auch in saurem Milieu aufrechterhalten und ist daher zum Eradizieren intrazellulärer Pathogene geeignet (ACOCELLA 1983).

4.2.2 Die Antibiotika sind effizienter bei der Inhibition von replikativen als von persistenten *C. psittaci*

In Zellkulturassays wurde die antibakterielle Aktivität von je einem Vertreter der o.g. Wirkstoffgruppen auf die replikative bzw. persistente *C. psittaci*- Infektion untersucht. Die Etablierung der Assays orientierte sich an einer Publikation von Reveneau und Kollegen (REVENEAU *et al.* 2005). Im Gegensatz zu dieser Publikation wurde hier nicht die Minimale Bakterizide Konzentration (MBC) der Antibiotika, welche die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums darstellt, die die Wiederanzüchtbarkeit von Chlamydien verhindert (DRESES-WERRINGLOER *et al.* 2000), angewendet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirksamkeit verschiedener Antibiotika in der Minimalen Hemmkonzentration auf die Reduktion replikativer und persistenter *C. psittaci* getestet. Weiterhin wurde die Wirkung der zehnfachen MIC untersucht, um einen bakteriziden Wirkungsbereich aller Antibiotika abzudecken. Zur Evaluation der chlamydizidalen Wirkung der Antibiotika wurde die Zahl wiederanzüchtbarer infektiöser EBs bestimmt. Durch Nyström- Rosander und Kollegen wurde beschrieben, dass der Zeitpunkt der Antibiotikagabe nach der Infektion sowie die Dauer der Behandlung einen Einfluss auf die Wirkung der Antibiotika haben (NYSTROM-ROSANDER *et al.* 1997). Daher wurden zwei Zeitpunkte der Antibiotikabehandlung ausgewählt, welche unterschiedliche *in vivo*- Situationen reflektieren soll-

ten sowie die Behandlung über einen kürzeren und einen längeren Zeitraum durchgeführt. Ein weiterer Aspekt, den es bei Design und Auswertung dieser Versuchsreihen zu berücksichtigen galt, war die potentielle Persistenz-induzierende Wirkung der Antibiotika (SCHOBORG 2011). Dieser Effekt wurde durch die Reaktivierung inhibierter Chlamydien in Antibiotika-freiem Medium aufgehoben, um die tatsächliche chlamydzidale Wirkung der Antibiotika deutlich machen zu können.

Die hier gewonnenen Daten bestätigen die einheitliche Ansicht, dass persistente Chlamydien widerstandsfähiger gegenüber einer antimikrobiellen Behandlung sind als replikative Chlamydien (GIEFFERS *et al.* 2001, HAMMERSCHLAG 2002, WYRICK and KNIGHT 2004). So können zwar auch replikative *C. psittaci* nicht vollständig eradiziert werden, jedoch ließ sich im Gegensatz zu persistenten *C. psittaci* eine stärkere Reduktion der rekultivierbaren EBs in Relation zur Antibiotika-unbehandelten Kontrolle erzielen.

Im Allgemeinen erwies sich Levofloxacin als das wirksamste Antibiotikum bei der Reduktion der wiederanzüchtbaren Chlamydien sowohl in replikativen als auch persistenten Infektionen. Doxycyclin war weniger effektiv bei der Verringerung rekultivierbarer Chlamydien als Levofloxacin, jedoch wirksamer als Erythromycin. Die Effizienz von Doxycyclin und Erythromycin ließ sich jedoch durch die Kombination mit Rifampicin signifikant verbessern.

Die Anwendung der einfachen MIC von Erythromycin, Rifampicin und ggf. auch Doxycyclin hatte bei früher und später Zugabe zu replikativen bzw. persistenten *C. psittaci* keinen signifikanten Effekt auf die Reduktion der rekultivierbaren Chlamydien. Dagegen wurde durch Levofloxacin oder Kombinationen mit Rifampicin eine bakteriostatische Wirkung verursacht. Durch Erhöhung der eingesetzten Antibiotikakonzentration auf die zehnfache MIC konnte zunächst die Bildung infektiöser Partikel nach Behandlung mit allen Antibiotika inhibiert werden. Doch auch hier erwies sich nach der Reaktivierung die Reduktion der rekultivierbaren EBs, welche v.a. durch Erythromycin und Rifampicin verursacht wurde als bakteriostatischer und damit reversibler Effekt, der jedoch durch Kombination beider Antibiotika verringert werden konnte.

Die Erklärung für die gute Wirksamkeit von Levofloxacin könnte durch seine bakterizide Wirkung begründet sein. Die im Vergleich zu den anderen untersuchten Antibiotika hohe MIC entspricht laut Literatur auch der Minimalen Bakteriziden Konzentration (DONATI *et al.* 1998, SMITH *et al.* 2004). Daher ist Levofloxacin, auch wenn es in der MIC und nicht direkt nach Infektion angewendet wird, in der Lage, Chlamydien abzutöten. Dabei lässt

sich eine leichte Steigerung der Wirkung durch Erhöhung der eingesetzten Konzentration erzielen.

Dagegen sind die MBCs von Doxycyclin, Erythromycin und Rifampicin weit höher als die hier ermittelten MICs (BIANCHI *et al.* 1991, LEFEVRE *et al.* 1993, LEFEVRE and LEPARGNEUR 1998, SAMRA *et al.* 2001). So kann die MIC zwar bei Zugabe direkt nach Infektion die Bildung von Inklusionen inhibieren, jedoch ist es nicht möglich, durch Zugabe dieser Konzentration zu einer etablierten Infektion einen bakteriziden Effekt zu erzielen. Während die Behandlung mit der einfachen MIC von Doxycyclin zumindest teilweise eine bakteriostatische Wirkung erzielte, konnte nach Erythromycin- bzw. Rifampicin- Behandlung nur eine geringfügige Reduktion der rekultivierbaren Chlamydien gegenüber der Kontrolle verzeichnet werden. Durch Erhöhung der eingesetzten Antibiotika-Konzentration auf die zehnfache MIC konnte auch für Erythromycin und Rifampicin ein bakteriostatischer Effekt erzielt werden.

Eine Steigerung der Wirksamkeit von Doxycyclin und Erythromycin konnte durch deren Kombination mit Rifampicin erreicht werden. Hierbei könnte es sich um einen synergistischen Effekt beider Antibiotika in Kombination handeln, deren Einzelwirkungen durch den Angriff auf zwei Zielstrukturen verstärkt werden. Ein solcher Effekt wurde durch die Gruppe um Freidank für Azithromycin in Kombination mit Rifampicin, nicht jedoch für Doxycyclin bzw. Ofloxacin und ihre Kombinationen mit Rifampicin beschrieben (FREIDANK *et al.* 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen vor allem bei früher Antibiotikagabe eine deutliche Steigerung der Wirksamkeit von Doxycyclin durch seine Kombination mit Rifampicin erzielt. Im Gegenzug ließ sich die Effizienz von Levofloxacin durch Rifampicin nicht in jedem Fall steigern, sondern wurde u.U. sogar geringer.

Eine weitere Erklärung für die bessere Wirksamkeit von Rifampicin- Kombinationen, vor allem nach 48- stündiger Inkubation in Antibiotika- freiem Medium, könnte die Akkumulation etwa der doppelten Menge Antibiotikum in der Zelle sein. So befindet sich nach Entzug der Antibiotika nicht nur eine bestimmte Menge eines Antibiotikums in der Zelle, sondern auch zusätzlich akkumuliertes Rifampicin. Dieses reicht aus, um die Teilung der Chlamydien auch unter Idealbedingungen in Antibiotika- und ggf. IFN γ - freiem Medium zu inhibieren und unter den gegebenen Umständen eine verringerte Reaktivierung hervorzurufen.

Bei später Zugabe der Antibiotika zu replikativen bzw. persistenten *C. psittaci* wurde die Wirksamkeit aller untersuchten Antibiotika herabgesetzt. Während 12 Stunden nach Infek-

tion zumindest in der replikativen Infektion eine weitestgehend homogene Population von chlamydialen, metabolisch aktiven RBs vorlag, war es 48 Stunden nach Infektion eine heterogene Population aus RBs und EBs. Die metabolisch inaktiven und nicht replizierenden EBs ließen sich daher durch die Antibiotika nicht eradizieren sondern lediglich, ähnlich der Bestimmung der MIC, inhibieren. Dieser bakteriostatische Effekt wurde jedoch durch Inkubation in Antibiotika-freiem Medium aufgehoben. Diese Ergebnisse werden durch die Gruppe um Notomi bestätigt, welche zeigte, dass sich die inhibitorische Konzentration von Antibiotika mit zunehmendem zeitlichen Abstand zur Infektion erhöhte (NOTOMI *et al.* 1999).

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass Levofloxacin, gefolgt von Doxycyclin die höchste Wirksamkeit bei der Reduktion replikativer und persistenter *C. psittaci* hatte. Erythromycin hingegen wies eine geringe Wirksamkeit auf, wobei seine chlamydzidale Wirkung jedoch durch die Kombination mit Rifampicin gesteigert werden konnte. Auch konnte gezeigt werden, dass persistente *C. psittaci* weniger sensitiv gegenüber einer antibiotischen Behandlung waren als replikative Chlamydien.

4.2.3 Die chlamydiale Genexpression reflektiert die unzureichende Wirksamkeit von Antibiotika gegenüber persistenten *C. psittaci*

Die im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Beobachtungen ließen sich auf molekularer Ebene durch die Analyse der chlamydialen Genexpression unter Antibiotikabehandlung bestätigen.

Da persistente Chlamydien *in vivo* mit den klassischen Zellkulturmethoden nicht ausreichend erfasst werden können, ist es nur schwer möglich, den Verlauf einer antibiotischen Therapie zu verfolgen. Durch den Nachweis chlamydialer Genexpression kann eine Aussage über die Lebensfähigkeit antibiotisch behandelter Chlamydien getroffen werden (MPIGA and RAVAOARINORO 2006b). Das in dieser Arbeit etablierte Modell der antibiotischen Therapie persistenter *C. psittaci* bietet die Möglichkeit, die chlamydiale Transkriptionsaktivität unter Antibiotikaeinfluss zu analysieren und ist eine der ersten Arbeiten, die diesen Aspekt untersucht. Es war weiterhin das Ziel, chlamydiale Kandidatengene definieren zu können, deren Transkription unter Einfluss von Antibiotika differentiell reguliert wird und somit das Monitoring einer Therapie erlaubt.

Zunächst wurde jedoch die relative Anzahl chlamydialer Genomäquivalente unter Antibiotikabehandlung im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle bestimmt. Diese molekulare Herangehensweise unterstrich die in den oben beschriebenen Zellkulturassays

gewonnenen Erkenntnisse, dass replikative Chlamydien bei früher Zugabe empfindlicher gegenüber einer Antibiotikabehandlung sind. Die frühe Antibiotikabehandlung von persistenten Chlamydien führte gegenüber replikativen Chlamydien, unabhängig vom eingesetzten Antibiotikum, zu einer geringeren Reduktion der relativen Genomäquivalente. Jedoch erwiesen sich sowohl replikative als auch persistente *C. psittaci* bei später Zugabe als weniger empfindlich gegenüber Antibiotika.

Die Analyse der differentiellen Transkription zeigte, dass replikative *C. psittaci* eher bei früher Antibiotikagabe mit einer Veränderung ihrer Transkriptionsaktivität reagierten, während persistente *C. psittaci* ihre Transkription bei später Zugabe der Antibiotika aktivierten. Doxycyclin und Erythromycin verursachten ähnliche Transkriptionsmuster der untersuchten Gene. Dagegen wurde durch Levofloxacin mehrheitlich eine Aktivierung der Transkription der analysierten Gene in replikativer und persistenter Infektion ausgelöst. Die Rifampicin- Behandlung replikativer *C. psittaci* führte zu einer Herunterregulierung der Transkription, während in der persistenten Infektion durch Rifampicin eine Aktivierung der Transkription hervorgerufen wurde.

Auffällig war im Wesentlichen die mitunter deutliche Herunterregulierung von *ompA*, einem Gen, dessen Produkt einen Membranbestandteil darstellt und welches daher wichtig für die Binäerspaltung der Chlamydien ist. Die Expression dieses Gens nach Antibiotikabehandlung spiegelt die Ergebnisse der Zellkulturassays wider. Die starke Herunterregulierung nach Levofloxacin- Behandlung bzw. Anwendung von Rifampicin einzeln oder in Kombination unterstreichen die Wirksamkeit diese Behandlungsstrategien bei der Reduktion rekultivierbarer Chlamydien. Die Hochregulierung der *ompA*- Transkripte nach Doxycyclin- oder Erythromycin- Behandlung spiegelt die verringerte Effizienz dieser Antibiotika wider. Die weniger stark ausgeprägte differentielle Transkription bzw. Hochregulation von *ompA* in persistenten Chlamydien bzw. bei später Zugabe der Antibiotika bestätigt deren unzureichende Effizienz, welche bereits durch o.g. Zellkulturversuche gezeigt wurde.

Mehrere Arbeitsgruppen haben die chlamydiale Transkription unter Antibiotikabehandlung analysiert und auch nach mehrtägiger Inkubationsdauer Transkripte verschiedener chlamydialer Gene nachweisen können (DRESES-WERRINGLOER *et al.* 2001, GIEFFERS *et al.* 2001, MPIGA and RAVAOARINORO 2006b). Die Transkription der transienten bzw. prozessierten Form der *16S rRNA* blieb konstant (MPIGA and RAVAOARINORO 2006b) oder nahm unter Antibiotikaeinfluss ab (DRESES-WERRINGLOER *et al.* 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde abhängig vom Zugabezeitpunkt eine Hoch- bzw. Herunterregulation der prozessierten Form der *16S rRNA* unter Antibiotikabehandlung nachgewiesen.

Dabei fiel die Reaktion der replikativen Chlamydien stärker aus als die der persistenten Chlamydien, was wiederum deren geringere Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika unterstreicht.

Auch *groEL*, das Gen für HSP60, wurde nach Antibiotikabehandlung replikativer und persistenter *C. psittaci* differentiell reguliert. Dabei fiel die Transkriptionsänderung bei der Behandlung replikativer *C. psittaci*, früher Zugabe der Antibiotika bzw. Kombination mit Rifampicin am stärksten aus. Auch die Literatur zeigt, dass sich Transkripte des HSP60-Gens noch Tage nach Zugabe der Antibiotika nachweisen ließen, ebenso wie Transkripte des Gens für MOMP, was mit den beschriebenen Beobachtungen für *ompA* einhergeht (GIEFFERS *et al.* 2001, MPIGA and RAVAOARINORO 2006b).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in dem betrachteten Zeitraum kein vollständiges Ausbleiben der Transkriptionsaktivität zu beobachten war, die Antibiotika also nicht in der Lage waren, die replikativen und persistenten *C. psittaci* abzutöten. Die nachgewiesene differentielle Transkription einiger Gene deutet jedoch auf einen stärkeren Einfluss der Antibiotika auf replikative Chlamydien hin und untermauert damit die Ergebnisse der Zellkulturversuche. Auch die Expression ausgewählter Gene wie *ompA* könnte auf die unterschiedliche Wirksamkeit verschiedener Antibiotika auf replikative und persistente Chlamydien hinweisen. Diese Gene könnten somit als chlamydiale Kandidatengene für das Monitoring einer antibiotischen Therapie dienen.

4.3 *IL-8* und *TNFRSF9* sind *in vitro* differentiell reguliert und dienen als Indikator der Infektion *in vivo*

4.3.1 Die Antibiotikabehandlung *C. psittaci*-infizierter A549-Zellen verursacht eine Herunterregulierung von *IL-8* und *TNFRSF9*

Mittels Genexpressionsanalysen sollten zum einen Einblicke in Entzündungs- und Tissue-Remodeling-Prozesse während einer *C. psittaci*-Infektion gewonnen werden. Zum anderen sollten Wirtszellgene identifiziert werden, welche sich durch ihre differentielle Transkription ebenfalls zum Überwachen einer antibiotischen Therapie eignen bzw. das Abklingen der Infektion und Entzündung anzeigen.

In dieser Arbeit wurde die Transkription ausgewählter chlamydialer Gene während der replikativen und persistenten Infektion bis 72 h p.i. analysiert. Dabei konnte für *IL-8* und *TNFRSF9* eine Steigerung der Transkriptionsaktivität gegenüber den entsprechenden nicht-infizierten Kontrollen festgestellt werden. Diese Ergebnisse bestätigen die von Anne Meinhardt in ihrer Bachelorarbeit generierten Daten für beide Gene (MEINHARDT 2011).

IL-8 ist ein starkes, pro- inflammatorisches Zytokin, welches u.a. für die Rekrutierung, Aktivierung und Formänderung von neutrophilen Granulozyten verantwortlich ist und deren Wanderung und Influx zum Infektionsort initiiert (MUKAIDA *et al.* 1998). Seine Expression findet in einer Vielzahl von Zelltypen statt (BAGGIOLINI and CLARK-LEWIS 1992). In gesunden Zellen wird IL-8 geringgradig konstitutiv exprimiert, allerdings wird seine Bildung sehr schnell durch pro- inflammatorische Zytokine, virale oder bakterielle Produkte oder Zellstress induziert (HOFFMANN *et al.* 2002, BUCHHOLZ and STEPHENS 2006). Bei der Pathogenese von Chlamydieninfektionen *in vivo* spielt IL-8 eine tragende Rolle. Es wird von den infizierten primären Zielzellen der Chlamydien sezerniert und löst somit eine Kaskade von Immunreaktionen aus (STEPHENS 2003). Auch in Tiermodellen wurde die Hochregulation von IL-8 als Antwort auf eine Chlamydieninfektion gezeigt (DARVILLE *et al.* 2001, DARVILLE *et al.* 2003, RANK *et al.* 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Gen für IL-8 im Modell der *C. psittaci*- Infektion alveolärer Epithelzellen sowohl in replikativ als auch persistent infizierten Zellen hochreguliert. Dies ist übereinstimmend mit Ergebnissen der Gruppen um Yang bzw. Entrican, die anhand derselben Zelllinie und *C. pneumoniae* eine Zeit- und Infektionsdosis- abhängige Hochregulation von IL-8 zeigten (YANG *et al.* 2003, ENTRICAN *et al.* 2004). Auch für *C. trachomatis*- infizierte epitheliale Zervixkarzinomzellen konnte eine Zeit- und Dosis- abhängige Aktivierung der Transkription und Sekretion von *IL-8* nachgewiesen werden (RASMUSSEN *et al.* 1997). In dem hier untersuchten Modell wurde in replikativ infizierten Zellen bereits nach 12, nicht aber nach 2 Stunden (MEINHARDT 2011), ein hohes Niveau der *IL-8*- Transkription erreicht und damit früher als in *C. pneumoniae*- oder *C. trachomatis*- infizierten Zellen (RASMUSSEN *et al.* 1997, YANG *et al.* 2003, ENTRICAN *et al.* 2004). Da die IL-8- Produktion der Wirtszellen abhängig von der chlamydialen Proteinexpression ist (RASMUSSEN *et al.* 1997, BUCHHOLZ and STEPHENS 2006), könnte der kürzere Lebenszyklus von *C. psittaci* gegenüber *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* für die beschleunigte Zytokinantwort der Wirtszelle verantwortlich sein. Der geringere Grad der *IL-8*- Hochregulation in der persistenten Infektion im Vergleich zur replikativen Infektion konnte auch durch Peters und Kollegen gezeigt werden (PETERS *et al.* 2005). Die in dieser Arbeit vorgestellte IFN γ - induzierte Transkription von *IL-8* in nicht- infizierten Zellen bestätigt die Arbeiten der Gruppen um Pawliczak bzw. Jerchel (PAWLICZAK *et al.* 2005, JERCHEL *et al.* 2014), wobei eine weitere Stimulation

der *IL-8*- Transkription durch Infektion mit *C. trachomatis* erzielt wurde (JERCHEL *et al.* 2014). Diese wurde hier für *C. psittaci* ebenfalls gezeigt.

Die Antibiotikabehandlung von replikativen bzw. persistenten *C. psittaci*- Infektionen hatte eine leichte Herunterregulation des *IL-8*- Gens zur Folge, wobei sich keine Abhängigkeit von einem Antibiotikum ergab. Dies impliziert die Unterdrückung der chlamydialen Proteinsynthese, die essentiell für die Stimulation der *IL-8*- Transkription ist (RASMUSSEN *et al.* 1997, BUCHHOLZ and STEPHENS 2006). Da drei von vier getesteten Antibiotika in die chlamydiale Proteinsynthese eingreifen, liegt daher die Inhibierung der *IL-8*- Transkription unter Antibiotikaeinfluss nahe. Ein langanhaltender inhibitorischer Effekt der Antibiotika auf die Chlamydien konnte nur bei später Zugabe zu einer replikativen Infektion beobachtet werden, indem die Transkriptionsaktivität von *IL-8* unter Antibiotikabehandlung und mit zunehmender Dauer gegenüber der unbehandelten Kontrolle abnahm. Dies bestätigt wiederum die Ergebnisse der Zellkulturversuche, in denen sich die replikative Infektion als empfindlicher gegenüber der Antibiotikabehandlung erwies als die persistente Infektion. Somit lässt sich ein anhaltender, bakteriostatischer oder bakterizider Effekt der untersuchten Antibiotika gegenüber replikativen *C. psittaci* postulieren, welcher sich ebenfalls in der Transkription von *IL-8* widerspiegelt.

Über das zweite analysierte Wirtszellgen *TNFRSF9* und sein entsprechendes Genprodukt ist im Zusammenhang mit bakteriellen Infektionen wenig bekannt. Die Expression des Rezeptors auf CD4+ und CD8+ T- Zellen wird durch die Aktivierung der T- Zellen induziert. Er wird aber auch an der Oberfläche von natürlichen Killerzellen, Dendritischen Zellen, Neutrophilen und Endothelzellen exprimiert, während sein Ligand von Antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird (VINAY and KWON 1998, BERTRAM *et al.* 2004, MARTÍNEZ GÓMEZ *et al.* 2014). TNFRSF9 und sein Ligand spielen eine wichtige Rolle als ko- stimulatorische Faktoren bei der Aktivierung von T- Lymphozyten und stellen Überleben, Proliferation und Zytokinsekretion der aktivierten T- Zelle sicher (KWON *et al.* 2000, MARTÍNEZ GÓMEZ *et al.* 2014). Die intrazelluläre Weitergabe der Signale erfolgt über NF- κ B oder die Aktivierung von JNK (KWON *et al.* 2000).

Die Expression von *TNFRSF9* wurde nach *C. psittaci*- Infektion der epithelialen A549- Zelllinie hochreguliert, wobei auch hier die Regulation in der replikativen Infektion deutlicher als in der persistenten Infektion ausfiel. Die Transkription dieses Gens unter Antibiotikaeinfluss wies ein vergleichbares Muster auf wie die *IL-8*- Transkription. In der persistenten Infektion erfolgte zunächst eine Herunterregulation der Transkription im

Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, welche jedoch nicht über den Zeitverlauf anhielt und somit die mangelnde Effizienz der Antibiotika bei der Eradikation persistenter Chlamydien reflektierte. Die Antibiotikabehandlung replikativ infizierter Zellen hatte eine zunehmende Reduktion der Transkripte zur Folge, was für eine bakteriostatische oder bakterizide Wirkung der Antibiotika spricht. Auch hier waren die Effekte Antibiotika-unabhängig.

4.3.2 IL-8 und TNFRSF9 sind im bovinen Modell der Antibiotikatherapie respiratorischer *C. psittaci*- Infektionen differentiell reguliert

Die *in vitro* untersuchten Behandlungsstrategien wurden auf das bovine Modell der respiratorischen *C. psittaci*- Infektion der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Reinhold des FLI übertragen und hinsichtlich verschiedener Parameter untersucht. Dabei wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die *in vitro* etablierten Methoden zur Detektion von mRNA chlamydialer Gene und von Transkriptionsänderungen boviner Gene angewendet.

Die Analyse der Transkription der chlamydialen Gene *gyrA*, *ftsW* und *ompA* konnte zum Zeitpunkt 4 dpi noch in bis zu 100 % der Tiere eines Behandlungsschemas nachgewiesen werden, während nur noch wenige Tiere zum Zeitpunkt 14 dpi eine Transkriptionsaktivität aufwiesen. Dabei zeigten Gruppen, welche mit Doxycyclin, Enrofloxacin bzw. Rifampicin behandelt wurden den höchsten Anteil Transkript- positiver Tiere.

Diese Abhängigkeit von einer bestimmten Antibiotikatherapie ließ sich durch die Analyse der Transkription von *IL-8* und *TNFRSF9* nicht bestätigen. Beide Gene wurden in BALFs infizierter Kälber zeitabhängig transkribiert, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen Antibiotika- behandelten und - unbehandelten Tieren detektiert werden konnten.

Interleukin 8 wird, wie oben bereits beschrieben wurde, von infizierten Epithelzellen gebildet und ist u.a. an der Aktivierung und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zum Infektionsherd beteiligt, wo diese ebenfalls IL-8 produzieren und sezernieren (BAZZONI *et al.* 1991, STEPHENS 2003). Die Lungen *C psittaci*- infizierter Kälber waren durch einen starken Influx neutrophiler Granulozyten gekennzeichnet (LAMBERTZ 2011, REINHOLD *et al.* 2012), die zum Zeitpunkt 4 dpi den Hauptbestandteil der entnommenen BALFs ausmachten und deren Anteil im weiteren Verlauf der Infektion abnahm (PROHL *et al.* 2015a, 2015b). Dies korreliert mit den hier gewonnenen Daten zur Transkription von *IL-8*. Diese war 4 Tage nach der Inokulation gegenüber den nicht- infizierten Tieren hochreguliert, nahm jedoch im Verlauf der Infektion kontinuierlich ab und lag 14 Tage nach Infektion unter dem Wert nicht- infizierter Kontrolltiere. Zwischen den BALFs Antibiotika-

behandelter und - unbehandelter Tiere konnte zum entsprechenden Zeitpunkt nach Infektion kein signifikanter Transkriptionsunterschied detektiert werden.

Auch die Verschiebung der Immunantwort hin zur Beteiligung von u.a. Dendritischen Zellen, T- und B- Lymphozyten zehn Tage nach Infektion (KNITTLER *et al.* 2014) könnte einen Anteil an der Verringerung der nachweisbaren *IL-8*- Transkriptionsaktivität haben und mit einer Zunahme der *TNFRSF9*- Transkripte korrelieren. Die Zunahme der Transkriptionsaktivität von *TNFRSF9* in Relation zur *GAPDH* in BALFs ist zwischen den Zeitpunkten 4 und 9 dpi zu beobachten, während die Veränderung der Transkription zwischen 9 und 14 dpi variabel ist.

Generell ist das relative Transkriptionsniveau von *TNFRSF9* in BALF- Zellen im Vergleich zu *IL-8* stark verringert, was damit zusammenhängen könnte, dass *TNFRSF9*- transkribierende Zellen vorrangig im Gewebe zu finden sind. So zeigte die, im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse von Lungengewebe infizierter und nicht- infizierter Kälber ein höheres Transkriptionsniveau von *TNFRSF9* in Relation zu *GAPDH*, während das relative Niveau von *IL-8* gegenüber den BALFs um mehr als eine \log_{10} - Stufe verringert war (siehe Abbildung 31 im Anhang, Kapitel 11.5; Ergebnisse im Rahmen einer Publikation in Kooperation mit A. Prohl, FLI Jena, erstellt) (PROHL *et al.* 2015c).

Die relative Expression von *TNFRSF9* im Vergleich zu *GAPDH* wurde 14 dpi in makroskopisch verändertem Gewebe, welches einem Infektionsherd entsprach, gegenüber unverändertem Gewebe signifikant hochreguliert (PROHL *et al.* 2015c). Dies korreliert mit der Rekrutierung von T- Lymphozyten und Dendritischen Zellen in die Regenerationszonen der Infektionsherde ab 10 dpi (KNITTLER *et al.* 2014), die diesen Rezeptor wie oben beschrieben exprimieren können. Durch die erhöhte Transkription dieses Gens kann die T- Zell- Antwort aufrechterhalten werden. Die verringerte *TNFRSF9*- Transkription in makroskopisch unverändertem Gewebe abseits der Infektionsherde spricht für eine geringere T- Zell- Aktivität und beweist, wie lokal begrenzt die Zell- vermittelte Immunantwort auf eine Chlamydieninfektion ist (PROHL *et al.* 2015c).

Die *IL-8*- Transkription wurde in Lungengewebe infizierter Tiere gegenüber nicht- infizierten Tieren herunterreguliert, wobei in makroskopisch verändertem Gewebe signifikant weniger exprimiert wurde als in unverändertem Gewebe (PROHL *et al.* 2015c). Dies lässt sich durch die histologische Untersuchung des betroffenen Gewebes erklären. So unterlagen Infektionsherde nach überstandener Infektion bereits der Regeneration (KNITTLER *et al.* 2014) wodurch keine Attraktion von neutrophilen Granulozyten notwendig war,

während das umliegende Gewebe durch *C. psittaci* infiziert wurde und eine initiale IL-8-Antwort durch die Epithelzellen ausgelöst wurde.

Auch die Analyse klinischer, pathologischer und inflammatorischer Parameter zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Antibiotika-behandelten und -unbehandelten Tieren bzw. zwischen den einzelnen Behandlungsregimes (PROHL *et al.* 2015a, 2015b, 2015c). Somit ist davon auszugehen, dass die Tiere die Infektion mit Hilfe ihrer Immunantwort und unabhängig von einer Antibiotikatherapie eradizieren konnten bzw. die Infektion ohne Symptome auszulösen chronifizierte.

5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte anhand eines IFN γ -induzierten Persistenzmodells für *Chlamydia psittaci* demonstriert werden, dass die Antibiotikabehandlung persistenter Chlamydien gegenüber der von replikativen Chlamydien eine unzureichende Wirksamkeit aufwies.

Die in der vorliegenden Arbeit etablierten *in vitro* Assays und Methoden bieten die Möglichkeit, verschiedene Parameter von Infektion und Antibiotikabehandlung zu variieren und deren Einfluss auf Chlamydien und Wirtszellen zu analysieren. So könnte die Analyse der Genexpression von chlamydialen und Wirtszellgenen unter Antibiotikabehandlung über einen längeren Zeitraum hinweg weitere Aufschlüsse über die Wirkung der Antibiotika sowie über die beteiligten Signalwege geben. Weiterhin könnten anhand dieses Modells alternative Therapieansätze, welche nicht nur Antibiotika umfassen, bezüglich ihrer Wirksamkeit gegen persistente Chlamydien getestet werden.

Auch die Optimierung des Tiermodells der respiratorischen *C. psittaci*- Infektion wäre ein weiterer wichtiger Aspekt. So ist eine Erhöhung des Stichprobenumfangs unerlässlich, um deutliche Aussagen treffen zu können. Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt wäre die Etablierung einer gesicherten chronischen respiratorischen *C. psittaci*- Infektion in Kälbern, welche sich durch persistierende inflammatorische und pathophysiologische Prozesse von der akuten respiratorischen Infektion abgrenzt. Dies könnte durch eine Anpassung der Infektionsdosis erreicht werden. Werden diese Faktoren berücksichtigt, könnten die erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich der effektivsten Antibiotikastrategie als Empfehlung für Therapieschemata der humanen, chronischen respiratorischen Chlamydieninfektion dienen.

6 Literaturverzeichnis

- ABDELRAHMAN, Y. M. and BELLAND, R. J. (2005). "The chlamydial developmental cycle." FEMS Microbiol Rev **29**(5): 949-959.
- ACOCELLA, G. (1983). "Pharmacokinetics and metabolism of rifampin in humans." Rev Infect Dis **5 Suppl 3**: S428-432.
- ANDREWS, J. M., HONEYBOURNE, D., JEVONS, G., BRENWALD, N. P., CUNNINGHAM, B. and WISE, R. (1997). "Concentrations of levofloxacin (HR 355) in the respiratory tract following a single oral dose in patients undergoing fibre-optic bronchoscopy." J Antimicrob Chemother **40**(4): 573-577.
- ARENS, M. and WEINGARTEN, M. (1981). "[Comparative studies of buffalo green monkey (BGM) cells and mice for the isolation of Chlamydia psittaci from avian droppings and organ samples]." Zentralbl Veterinarmed B **28**(4): 301-309.
- BAGGIOLINI, M. and CLARK-LEWIS, I. (1992). "Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine." FEBS Lett **307**(1): 97-101.
- BAHRAMI, F., MORRIS, D. L. and POURGHOLAMI, M. H. (2012). "Tetracyclines: drugs with huge therapeutic potential." Mini Rev Med Chem **12**(1): 44-52.
- BARRON, A. L., OLSHEVSKY, C. and COHEN, M. M. (1970). "Characteristics of the BGM line of cells from African green monkey kidney. Brief report." Arch Gesamte Virusforsch **32**(4): 389-392.
- BAUMERT, J., SCHMIDT, K. H., EITNER, A., STRAUBE, E. and RODEL, J. (2009). "Host cell cytokines induced by Chlamydia pneumoniae decrease the expression of interstitial collagens and fibronectin in fibroblasts." Infect Immun **77**(2): 867-876.
- BAZZONI, F., CASSATELLA, M. A., ROSSI, F., CESKA, M., DEWALD, B. and BAGGIOLINI, M. (1991). "Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8." J Exp Med **173**(3): 771-774.
- BEATTY, W. L., BELANGER, T. A., DESAI, A. A., MORRISON, R. P. and BYRNE, G. I. (1994a). "Role of tryptophan in gamma interferon-mediated chlamydial persistence." Ann N Y Acad Sci **730**: 304-306.
- BEATTY, W. L., BELANGER, T. A., DESAI, A. A., MORRISON, R. P. and BYRNE, G. I. (1994b). "Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence." Infect Immun **62**(9): 3705-3711.
- BEATTY, W. L., MORRISON, R. P. and BYRNE, G. I. (1994c). "Immunoelectron-microscopic quantitation of differential levels of chlamydial proteins in a cell culture model of persistent Chlamydia trachomatis infection." Infect Immun **62**(9): 4059-4062.
- BEATTY, W. L., MORRISON, R. P. and BYRNE, G. I. (1994d). "Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis." Microbiol Rev **58**(4): 686-699.
- BEBEAR, C. and DE BARBEYRAC, B. (2009). "Genital Chlamydia trachomatis infections." Clin Microbiol Infect **15**(1): 4-10.
- BEECKMAN, D. S., GEENS, T., TIMMERMANS, J. P., VAN OOSTVELDT, P. and VANROMPAY, D. C. (2008). "Identification and characterization of a type III secretion system in Chlamydia psittaci." Vet Res **39**(3): 27.
- BEECKMAN, D. S. and VANROMPAY, D. C. (2009). "Zoonotic Chlamydia psittaci infections from a clinical perspective." Clin Microbiol Infect **15**(1): 11-17.

- BELLAND, R. J., NELSON, D. E., VIROK, D., CRANE, D. D., HOGAN, D., STURDEVANT, D., BEATTY, W. L. and CALDWELL, H. D. (2003). "Transcriptome analysis of chlamydial growth during IFN-gamma-mediated persistence and reactivation." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15971-15976.
- BERTRAM, E. M., DAWICKI, W. and WATTS, T. H. (2004). "Role of T cell costimulation in anti-viral immunity." Seminars in Immunology **16**(3): 185-196.
- BIANCHI, A., SCIEUX, C., ROBACHE, S., VASSIAS, I. and PEROL, Y. (1991). "[Comparative study of minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal lethal concentration (MLC) values for tetracycline, monocycline, erythromycin and rokitamycin against eleven strains of Chlamydia trachomatis]." Pathol Biol (Paris) **39**(5): 442-445.
- BINET, R. and MAURELLI, A. T. (2007). "Frequency of development and associated physiological cost of azithromycin resistance in Chlamydia psittaci 6BC and C. trachomatis L2." Antimicrob Agents Chemother **51**(12): 4267-4275.
- BLASI, F., TARSIA, P. and ALIBERTI, S. (2009). "Chlamydophila pneumoniae." Clin Microbiol Infect **15**(1): 29-35.
- BOREL, N., KEMPF, E., HOTZEL, H., SCHUBERT, E., TORGERSON, P., SLICKERS, P., EHRLICH, R., TASARA, T., POSPISCHIL, A. and SACHSE, K. (2008). "Direct identification of chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay: a validation study." Mol Cell Probes **22**(1): 55-64.
- BRAGINA, E. Y., GOMBERG, M. A. and DMITRIEV, G. A. (2001). "Electron microscopic evidence of persistent chlamydial infection following treatment." J Eur Acad Dermatol Venereol **15**(5): 405-409.
- BRUMFITT, W., DIXSON, S. and HAMILTON-MILLER, J. M. (1983). "Use of rifampin for the treatment of urinary tract infections." Rev Infect Dis **5 Suppl 3**: S573-582.
- BRUNHAM, R. C., MACLEAN, I. W., BINNS, B. and PEELING, R. W. (1985). "Chlamydia trachomatis: its role in tubal infertility." J Infect Dis **152**(6): 1275-1282.
- BUCHHOLZ, K. R. and STEPHENS, R. S. (2006). "Activation of the host cell proinflammatory interleukin-8 response by Chlamydia trachomatis." Cell Microbiol **8**(11): 1768-1779.
- BUSH, R. M. and EVERETT, K. D. (2001). "Molecular evolution of the Chlamydiaceae." Int J Syst Evol Microbiol **51**(Pt 1): 203-220.
- BUTAYE, P., DUCATELLE, R., DE BACKER, P., VERMEERSCH, H., REMON, J. P. and HAESEBROUCK, F. (1997). "In vitro activities of doxycycline and enrofloxacin against European Chlamydia psittaci strains from turkeys." Antimicrob Agents Chemother **41**(12): 2800-2801.
- BYRNE, G. I. and KRUEGER, D. A. (1983). "Lymphokine-mediated inhibition of Chlamydia replication in mouse fibroblasts is neutralized by anti-gamma interferon immunoglobulin." Infect Immun **42**(3): 1152-1158.
- BYRNE, G. I., LEHMANN, L. K. and LANDRY, G. J. (1986). "Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular Chlamydia psittaci replication in T24 cells." Infect Immun **53**(2): 347-351.
- BYRNE, G. I., OUELLETTE, S. P., WANG, Z., RAO, J. P., LU, L., BEATTY, W. L. and HUDSON, A. P. (2001). "Chlamydia pneumoniae expresses genes required for DNA replication but not cytokinesis during persistent infection of HEP-2 cells." Infect Immun **69**(9): 5423-5429.
- CALDWELL, H. D., WOOD, H., CRANE, D., BAILEY, R., JONES, R. B., MABEY, D., MACLEAN, I., MOHAMMED, Z., PEELING, R., ROSHICK, C., SCHACHTER, J., SOLOMON, A. W., STAMM, W. E., SUCHLAND, R. J., TAYLOR, L., WEST, S. K., QUINN, T. C., BELLAND, R. J. and MCCLARTY, G. (2003). "Polymorphisms in Chlamydia trachomatis tryptophan synthase genes differentiate between genital and ocular isolates." J Clin Invest **111**(11): 1757-1769.

- CARTER, J. D., ESPINOZA, L. R., INMAN, R. D., SNEED, K. B., RICCA, L. R., VASEY, F. B., VALERIANO, J., STANICH, J. A., OSZUST, C., GERARD, H. C. and HUDSON, A. P. (2010). "Combination antibiotics as a treatment for chronic Chlamydia-induced reactive arthritis: a double-blind, placebo-controlled, prospective trial." *Arthritis Rheum* **62**(5): 1298-1307.
- CARTER, J. D., VALERIANO, J. and VASEY, F. B. (2004). "Doxycycline versus doxycycline and rifampin in undifferentiated spondyloarthropathy, with special reference to chlamydia-induced arthritis. A prospective, randomized 9-month comparison." *The Journal of Rheumatology* **31**(10): 1973-1980.
- CHANUDET, E., ZHOU, Y., BACON, C. M., WOTHERSPOON, A. C., MULLER-HERMELINK, H. K., ADAM, P., DONG, H. Y., DE JONG, D., LI, Y., WEI, R., GONG, X., WU, Q., RANALDI, R., GOTERI, G., PILERI, S. A., YE, H., HAMOUDI, R. A., LIU, H., RADFORD, J. and DU, M. Q. (2006). "Chlamydia psittaci is variably associated with ocular adnexal MALT lymphoma in different geographical regions." *J Pathol* **209**(3): 344-351.
- CHOPRA, I., HAWKEY, P. M. and HINTON, M. (1992). "Tetracyclines, molecular and clinical aspects." *J Antimicrob Chemother* **29**(3): 245-277.
- CLIFTON, D. R., FIELDS, K. A., GRIESHABER, S. S., DOOLEY, C. A., FISCHER, E. R., MEAD, D. J., CARABEO, R. A. and HACKSTADT, T. (2004). "A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 10166-10171.
- COOMBES, B. K. and MAHONY, J. B. (2001). "cDNA array analysis of altered gene expression in human endothelial cells in response to Chlamydia pneumoniae infection." *Infect Immun* **69**(3): 1420-1427.
- DALHOFF, A. (2005). "Immunomodulatory activities of fluoroquinolones." *Infection* **33 Suppl 2**: 55-70.
- DARVILLE, T., ANDREWS, C. W., JR., SIKES, J. D., FRALEY, P. L. and RANK, R. G. (2001). "Early local cytokine profiles in strains of mice with different outcomes from chlamydial genital tract infection." *Infect Immun* **69**(6): 3556-3561.
- DARVILLE, T., O'NEILL, J. M., ANDREWS, C. W., JR., NAGARAJAN, U. M., STAHL, L. and OJCIUS, D. M. (2003). "Toll-like receptor-2, but not Toll-like receptor-4, is essential for development of oviduct pathology in chlamydial genital tract infection." *J Immunol* **171**(11): 6187-6197.
- DEAN, D., ROTHSCILD, J., RUETTGER, A., KANDEL, R. P. and SACHSE, K. (2013). "Zoonotic Chlamydiaceae species associated with trachoma, Nepal." *Emerg Infect Dis* **19**(12): 1948-1955.
- DEAN, D., SUCHLAND, R. J. and STAMM, W. E. (2000). "Evidence for long-term cervical persistence of Chlamydia trachomatis by omp1 genotyping." *J Infect Dis* **182**(3): 909-916.
- DESSUS-BABUS, S., BEBEAR, C. M., CHARRON, A., BEBEAR, C. and DE BARBEYRAC, B. (1998). "Sequencing of gyrase and topoisomerase IV quinolone-resistance-determining regions of Chlamydia trachomatis and characterization of quinolone-resistant mutants obtained In vitro." *Antimicrob Agents Chemother* **42**(10): 2474-2481.
- DESSUS-BABUS, S., DARVILLE, T. L., CUOZZO, F. P., FERGUSON, K. and WYRICK, P. B. (2002). "Differences in innate immune responses (in vitro) to HeLa cells infected with nondisseminating serovar E and disseminating serovar L2 of Chlamydia trachomatis." *Infect Immun* **70**(6): 3234-3248.
- DETTE, G. A. (1980). "Serum and tissue concentrations of erythromycin: A review." *Current Medical Research and Opinion* **6**(s8): 23-28.
- DONACHIE, W. D. (1993). "The cell cycle of Escherichia coli." *Annu Rev Microbiol* **47**: 199-230.

- DONATI, M., DI FRANCESCO, A., D'ANTUONO, A., DELUCCA, F., SHURDHI, A., MORONI, A., BALDELLI, R. and CEVENINI, R. (2010). "In vitro activities of several antimicrobial agents against recently isolated and genotyped *Chlamydia trachomatis* urogenital serovars D through K." Antimicrob Agents Chemother **54**(12): 5379-5380.
- DONATI, M., POLLINI, G. M., SPARACINO, M., FORTUGNO, M. T., LAGHI, E. and CEVENINI, R. (2002). "Comparative in vitro activity of garenoxacin against *Chlamydia* spp." J Antimicrob Chemother **50**(3): 407-410.
- DONATI, M., RUMPIANESI, F., MARCHETTI, F., SAMBRI, V. and CEVENINI, R. (1998). "Comparative in-vitro activity of levofloxacin against *Chlamydia* spp." J Antimicrob Chemother **42**(5): 670-671.
- DRESES-WERRINGLOER, U., PADUBRIN, I., JURGENS-SAATHOFF, B., HUDSON, A. P., ZEIDLER, H. and KOHLER, L. (2000). "Persistence of *Chlamydia trachomatis* is induced by ciprofloxacin and ofloxacin in vitro." Antimicrob Agents Chemother **44**(12): 3288-3297.
- DRESES-WERRINGLOER, U., PADUBRIN, I., KOHLER, L. and HUDSON, A. P. (2003). "Detection of nucleotide variability in *rpoB* in both rifampin-sensitive and rifampin-resistant strains of *Chlamydia trachomatis*." Antimicrob Agents Chemother **47**(7): 2316-2318.
- DRESES-WERRINGLOER, U., PADUBRIN, I., ZEIDLER, H. and KOHLER, L. (2001). "Effects of azithromycin and rifampin on *Chlamydia trachomatis* infection in vitro." Antimicrob Agents Chemother **45**(11): 3001-3008.
- DUMKE, R., SCHNEE, C., PLETZ, M. W., RUPP, J., JACOBS, E., SACHSE, K., ROHDE, G. and GROUP, C. S. (2015). "Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia spp. Infection in Community-Acquired Pneumonia, Germany, 2011–2012." Emerging Infectious Disease journal **21**(3): 426.
- ENGSTROM, P., BAILEY, L., ONSKOG, T., BERGSTROM, S. and JOHANSSON, J. (2010). "A comparative study of RNA and DNA as internal gene expression controls early in the developmental cycle of *Chlamydia pneumoniae*." FEMS Immunol Med Microbiol **58**(2): 244-253.
- ENTRICAN, G., WATTEGEDERA, S., ROCCHI, M., FLEMING, D. C., KELLY, R. W., WATHNE, G., MAGDALENIC, V. and HOWIE, S. E. (2004). "Induction of inflammatory host immune responses by organisms belonging to the genera *Chlamydia*/*Chlamydophila*." Vet Immunol Immunopathol **100**(3-4): 179-186.
- ESSIG, A. and MARRE, R. (1997). "[Diagnosis and therapy of chlamydia infections]." Dtsch Med Wochenschr **122**(31-32): 971-975.
- ETIENNE, J., ORY, D., THOUVENOT, D., EB, F., RAOULT, D., LOIRE, R., DELAHAYE, J. P. and BEAUNE, J. (1992). "Chlamydial endocarditis: a report on ten cases." Eur Heart J **13**(10): 1422-1426.
- EVERETT, K. D., BUSH, R. M. and ANDERSEN, A. A. (1999). "Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms." Int J Syst Bacteriol **49 Pt 2**: 415-440.
- FADEL, S. and ELEY, A. (2007). "Chlamydia trachomatis OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin." J Med Microbiol **56**(Pt 1): 15-22.
- FECHTNER, T., STALLMANN, S., MOELLEKEN, K., MEYER, K. L. and HEGEMANN, J. H. (2013). "Characterization of the interaction between the chlamydial adhesin OmcB and the human host cell." J Bacteriol **195**(23): 5323-5333.

- FEHLNER-GARDINER, C., ROSHICK, C., CARLSON, J. H., HUGHES, S., BELLAND, R. J., CALDWELL, H. D. and MCCLARTY, G. (2002). "Molecular basis defining human Chlamydia trachomatis tissue tropism. A possible role for tryptophan synthase." J Biol Chem **277**(30): 26893-26903.
- FERRERI, A. J., DOLCETTI, R., DOGNINI, G. P., MALABARBA, L., VICARI, N., PASINI, E., PONZONI, M., CANGI, M. G., PECCIARINI, L., RESTI, A. G., DOGLIONI, C., ROSSINI, S. and MAGNINO, S. (2008). "Chlamydophila psittaci is viable and infectious in the conjunctiva and peripheral blood of patients with ocular adnexal lymphoma: results of a single-center prospective case-control study." Int J Cancer **123**(5): 1089-1093.
- FERRERI, A. J., GUIDOBONI, M., PONZONI, M., DE CONCILIIIS, C., DELL'ORO, S., FLEISCHHAUER, K., CAGGIARI, L., LETTINI, A. A., DAL CIN, E., IERI, R., FRESCHI, M., VILLA, E., BOIOCCHI, M. and DOLCETTI, R. (2004). "Evidence for an association between Chlamydia psittaci and ocular adnexal lymphomas." J Natl Cancer Inst **96**(8): 586-594.
- FIEGL, D., KAGEBEIN, D., LIEBLER-TENORIO, E. M., WEISSER, T., SENS, M., GUTJAHR, M. and KNITTLER, M. R. (2013). "Amphisomal route of MHC class I cross-presentation in bacteria-infected dendritic cells." J Immunol **190**(6): 2791-2806.
- FISH, D. N. (2003). "Levofloxacin: update and perspectives on one of the original 'respiratory quinolones'." Expert Rev Anti Infect Ther **1**(3): 371-387.
- FRAEYMAN, A., BOEL, A., VAN VAERENBERGH, K. and DE BEENHOUWER, H. (2010). "Atypical pneumonia due to Chlamydophila psittaci: 3 case reports and review of literature." Acta Clin Belg **65**: 192 - 196.
- FREIDANK, H. M., LOSCH, P., VOGELE, H. and WIEDMANN-AL-AHMAD, M. (1999). "In vitro susceptibilities of Chlamydia pneumoniae isolates from German patients and synergistic activity of antibiotic combinations." Antimicrob Agents Chemother **43**(7): 1808-1810.
- FRIIS, R. R. (1972). "Interaction of L cells and Chlamydia psittaci: entry of the parasite and host responses to its development." J Bacteriol **110**(2): 706-721.
- GERARD, H. C., BRANIGAN, P. J., SCHUMACHER, H. R., JR. and HUDSON, A. P. (1998). "Synovial Chlamydia trachomatis in patients with reactive arthritis/Reiter's syndrome are viable but show aberrant gene expression." J Rheumatol **25**(4): 734-742.
- GERARD, H. C., WHITTUM-HUDSON, J. A. and HUDSON, A. P. (1997). "Genes required for assembly and function of the protein synthetic system in Chlamydia trachomatis are expressed early in elementary to reticulate body transformation." Mol Gen Genet **255**(6): 637-642.
- GIARD, D. J., AARONSON, S. A., TODARO, G. J., ARNSTEIN, P., KERSEY, J. H., DOSIK, H. and PARKS, W. P. (1973). "In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors." J Natl Cancer Inst **51**(5): 1417-1423.
- GIEFFERS, J., FULLGRAF, H., JAHN, J., KLINGER, M., DALHOFF, K., KATUS, H. A., SOLBACH, W. and MAASS, M. (2001). "Chlamydia pneumoniae infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment." Circulation **103**(3): 351-356.
- GIEFFERS, J., SOLBACH, W. and MAASS, M. (1998). "In vitro susceptibilities of Chlamydia pneumoniae strains recovered from atherosclerotic coronary arteries." Antimicrob Agents Chemother **42**(10): 2762-2764.
- GOELLNER, S., SCHUBERT, E., LIEBLER-TENORIO, E., HOTZEL, H., SALUZ, H. P. and SACHSE, K. (2006). "Transcriptional response patterns of Chlamydophila psittaci in different in vitro models of persistent infection." Infect Immun **74**(8): 4801-4808.
- GOTH, S. R. and STEPHENS, R. S. (2001). "Rapid, transient phosphatidylserine externalization induced in host cells by infection with Chlamydia spp." Infect Immun **69**(2): 1109-1119.
- GRAYSTON, J. T. and WANG, S. (1975). "New knowledge of chlamydiae and the diseases they cause." J Infect Dis **132**(1): 87-105.

- GRIFFIN, M. O., FRICOVSKY, E., CEBALLOS, G. and VILLARREAL, F. (2010). "Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature." American Journal of Physiology - Cell Physiology **299**(3): C539-C548.
- GROSSE, C. (2012). "Interaction of Chlamydia trachomatis with the host cell MHC class I antigen presentation pathway during active and persistent infection". Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- HACKSTADT, T., TODD, W. J. and CALDWELL, H. D. (1985). "Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of chlamydiae?" J Bacteriol **161**(1): 25-31.
- HAMMERSCHLAG, M. R. (2000). "Chlamydia pneumoniae and the lung." Eur Respir J **16**(5): 1001-1007.
- HAMMERSCHLAG, M. R. (2002). "The intracellular life of chlamydiae." Semin Pediatr Infect Dis **13**(4): 239-248.
- HAMMERSCHLAG, M. R., CHIRGWIN, K., ROBLIN, P. M., GELLING, M., DUMORNAY, W., MANDEL, L., SMITH, P. and SCHACHTER, J. (1992a). "Persistent infection with Chlamydia pneumoniae following acute respiratory illness." Clin Infect Dis **14**(1): 178-182.
- HAMMERSCHLAG, M. R., QUMEI, K. K. and ROBLIN, P. M. (1992b). "In vitro activities of azithromycin, clarithromycin, L-ofloxacin, and other antibiotics against Chlamydia pneumoniae." Antimicrob Agents Chemother **36**(7): 1573-1574.
- HARTNETT, B. J. and MARLIN, G. E. (1976). "Doxycycline in serum and bronchial secretions." Thorax **31**(2): 144-148.
- HEDDEMA, E. R., VAN HANNEN, E. J., DUIM, B., DE JONGH, B. M., KAAAN, J. A., VAN KESSEL, R., LUMEIJ, J. T., VISSER, C. E. and VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. (2006). "An outbreak of psittacosis due to Chlamydophila psittaci genotype A in a veterinary teaching hospital." J Med Microbiol **55**(Pt 11): 1571-1575.
- HESS, S., RHEINHEIMER, C., TIDOW, F., BARTLING, G., KAPS, C., LAUBER, J., BUER, J. and KLOS, A. (2001). "The reprogrammed host: Chlamydia trachomatis-induced up-regulation of glycoprotein 130 cytokines, transcription factors, and antiapoptotic genes." Arthritis Rheum **44**(10): 2392-2401.
- HIRAI, K. and UNE, T. (1986). "Antichlamydial activity of ofloxacin." Microbiol Immunol **30**(5): 445-450.
- HOBSON, D., LEE, N., QUAYLE, E. and BECKETT, E. E. (1982). "Growth of Chlamydia trachomatis in Buffalo green monkey cells." Lancet **2**(8303): 872-873.
- HOFFMANN, E., DITTRICH-BREIHOLZ, O., HOLTMANN, H. and KRACHT, M. (2002). "Multiple control of interleukin-8 gene expression." J Leukoc Biol **72**(5): 847-855.
- HOGAN, R. J., MATHEWS, S. A., MUKHOPADHYAY, S., SUMMERSGILL, J. T. and TIMMS, P. (2004). "Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm." Infect Immun **72**(4): 1843-1855.
- HOLLAND, S. M., HUDSON, A. P., BOBO, L., WHITTUM-HUDSON, J. A., VISCIDI, R. P., QUINN, T. C. and TAYLOR, H. R. (1992). "Demonstration of chlamydial RNA and DNA during a culture-negative state." Infect Immun **60**(5): 2040-2047.
- HORN, M. (2011). "Phylum XXIV. Chlamydiae Garrity and Holt 2001." Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition, Volume Four The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes: 843-877.
- JARIWALLA, A. G., DAVIES, B. H. and WHITE, J. (1980). "Infective endocarditis complicating psittacosis: response to rifampicin." Br Med J **280**(6208): 155.

- JERCHEL, S., KAUFHOLD, I., SCHUCHARDT, L., SHIMA, K. and RUPP, J. (2014). "Host immune responses after hypoxic reactivation of IFN-gamma induced persistent Chlamydia trachomatis infection." Front Cell Infect Microbiol **4**: 43.
- JONES, R. B., RIDGWAY, G. L., BOULDING, S. and HUNLEY, K. L. (1983). "In vitro activity of rifamycins alone and in combination with other antibiotics against Chlamydia trachomatis." Rev Infect Dis **5 Suppl 3**: S556-561.
- JOSHI, N. and MILLER, D. Q. (1997). "Doxycycline revisited." Arch Intern Med **157**(13): 1421-1428.
- KIMURA, M., KISHIMOTO, T., NIKI, Y. and SOEJIMA, R. (1993). "In vitro and in vivo antichlamydial activities of newly developed quinolone antimicrobial agents." Antimicrob Agents Chemother **37**(4): 801-803.
- KLOS, A., THALMANN, J., PETERS, J., GERARD, H. C. and HUDSON, A. P. (2009). "The transcript profile of persistent Chlamydia pneumoniae in vitro depends on the means by which persistence is induced." FEMS Microbiol Lett **291**(1): 120-126.
- KNITTLER, M. R., BERNDT, A., BOCKER, S., DUTOW, P., HANEL, F., HEUER, D., KAGEBEIN, D., KLOS, A., KOCH, S., LIEBLER-TENORIO, E., OSTERMANN, C., REINHOLD, P., SALUZ, H. P., SCHOFL, G., SEHNERT, P. and SACHSE, K. (2014). "Chlamydia psittaci: New insights into genomic diversity, clinical pathology, host-pathogen interaction and anti-bacterial immunity." Int J Med Microbiol **304**(7): 877-893.
- KOKAB, A., JENNINGS, R., ELEY, A., PACEY, A. A. and CROSS, N. A. (2010). "Analysis of modulated gene expression in a model of Interferon-gamma-induced persistence of Chlamydia trachomatis in HEP-2 cells." Microb Pathog **49**(5): 217-225.
- KORMAN, T. M., TURNIDGE, J. D. and GRAYSON, M. L. (1997). "Neurological complications of chlamydial infections: case report and review." Clin Infect Dis **25**(4): 847-851.
- KUTLIN, A., ROBLIN, P. M. and HAMMERSCHLAG, M. R. (1999). "In vitro activities of azithromycin and ofloxacin against Chlamydia pneumoniae in a continuous-infection model." Antimicrob Agents Chemother **43**(9): 2268-2272.
- KWON, B., MOON, C. H., KANG, S., SEO, S. K. and KWON, B. S. (2000). "4-1BB: still in the midst of darkness." Mol Cells **10**(2): 119-126.
- LAD, S. P., LI, J., DA SILVA CORREIA, J., PAN, Q., GADWAL, S., ULEVITCH, R. J. and LI, E. (2007). "Cleavage of p65/RelA of the NF-kappaB pathway by Chlamydia." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(8): 2933-2938.
- LAMAS, C. C. and EYKYN, S. J. (2003). "Blood culture negative endocarditis: analysis of 63 cases presenting over 25 years." Heart **89**(3): 258-262.
- LAMBERTZ, J. (2011). "Untersuchungen zur Pathologie und Pathogenese der experimentellen aerogenen Infektion von Kälbern mit Chlamydia psittaci (nicht aviärer Herkunft)". Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- LAROUCAU, K., DE BARBEYRAC, B., VORIMORE, F., CLERC, M., BERTIN, C., HARKINEZHAD, T., VERMINNEN, K., OBENICHE, F., CAPEK, I., BEBEAR, C., DURAND, B., ZANELLA, G., VANROMPAY, D., GARIN-BASTUJI, B. and SACHSE, K. (2009). "Chlamydial infections in duck farms associated with human cases of psittacosis in France." Vet Microbiol **135**(1-2): 82-89.
- LEE, L. J., SHA, X., GOTFRIED, M. H., HOWARD, J. R., DIX, R. K. and FISH, D. N. (1998). "Penetration of levofloxacin into lung tissue after oral administration to subjects undergoing lung biopsy or lobectomy." Pharmacotherapy **18**(1): 35-41.
- LEFEVRE, J. C., ESCAFFRE, M. C., COURDIL, M. and LARENG, M. B. (1993). "In vitro evaluation of activities of azithromycin, clarithromycin and sparflaxacin against Chlamydia trachomatis." Pathol Biol (Paris) **41**(4): 313-315.

- LEFEVRE, J. C. and LEPARGNEUR, J. P. (1998). "Comparative in vitro susceptibility of a tetracycline-resistant *Chlamydia trachomatis* strain isolated in Toulouse (France)." Sex Transm Dis **25**(7): 350-352.
- LIEBER, M., SMITH, B., SZAKAL, A., NELSON-REES, W. and TODARO, G. (1976). "A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells." Int J Cancer **17**(1): 62-70.
- LINDNER, S. (2013). "Influence of antimicrobial treatment on gene expression in a bovine model of respiratory *Chlamydia psittaci* infection". Masterarbeit, Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Jena.
- LONGBOTTOM, D. and COULTER, L. J. (2003). "Animal chlamydioses and zoonotic implications." J Comp Pathol **128**(4): 217-244.
- LOOMIS, W. P. and STARNBACH, M. N. (2002). "T cell responses to *Chlamydia trachomatis*." Curr Opin Microbiol **5**(1): 87-91.
- LOVMAR, M., TENSON, T. and EHRENBERG, M. (2004). "Kinetics of macrolide action: the josamycin and erythromycin cases." J Biol Chem **279**(51): 53506-53515.
- LUTZ-WOHLGROTH, L., BECKER, A., BRUGNERA, E., HUAT, Z. L., ZIMMERMANN, D., GRIMM, F., HAESSIG, M., GREUB, G., KAPS, S., SPIESS, B., POSPISCHIL, A. and VAUGHAN, L. (2006). "Chlamydiales in guinea-pigs and their zoonotic potential." J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med **53**(4): 185-193.
- MABEY, D. C., SOLOMON, A. W. and FOSTER, A. (2003). "Trachoma." Lancet **362**(9379): 223-229.
- MALINVERNI, R., KUO, C. C., CAMPBELL, L. A. and GRAYSTON, J. T. (1995). "Reactivation of *Chlamydia pneumoniae* lung infection in mice by cortisone." J Infect Dis **172**(2): 593-594.
- MANNONEN, L., KAMPING, E., PENTTILA, T. and PUOLAKKAINEN, M. (2004). "IFN-gamma induced persistent *Chlamydia pneumoniae* infection in HL and Mono Mac 6 cells: characterization by real-time quantitative PCR and culture." Microb Pathog **36**(1): 41-50.
- MARTIN, J. R., JOHNSON, P. and MILLER, M. F. (1985). "Uptake, accumulation, and egress of erythromycin by tissue culture cells of human origin." Antimicrob Agents Chemother **27**(3): 314-319.
- MARTÍNEZ GÓMEZ, J. M., KOH, V. H. Q., YAN, B., LIN, W., ANG, M. L. T., RAHIM, S. Z. Z., PETHE, K., SCHWARZ, H. and ALONSO, S. (2014). "Role of the CD137 ligand (CD137L) signaling pathway during *Mycobacterium tuberculosis* infection." Immunobiology **219**(1): 78-86.
- MATHER, L. E., AUSTIN, K. L., PHILPOT, C. R. and MCDONALD, P. J. (1981). "Absorption and bioavailability of oral erythromycin." Br J Clin Pharmacol **12**(2): 131-140.
- MATHEWS, S., GEORGE, C., FLEGG, C., STENZEL, D. and TIMMS, P. (2001). "Differential expression of ompA, ompB, pyk, nlpD and Cpn0585 genes between normal and interferon-gamma treated cultures of *Chlamydia pneumoniae*." Microb Pathog **30**(6): 337-345.
- MATSUMOTO, A. (1973). "Fine structures of cell envelopes of *Chlamydia* organisms as revealed by freeze-etching and negative staining techniques." J Bacteriol **116**(3): 1355-1363.
- MATSUMOTO, A. and MANIRE, G. P. (1970). "Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*." J Bacteriol **101**(1): 278-285.
- MAURIN, M., BENOLIEL, A. M., BONGRAND, P. and RAOULT, D. (1992). "Phagolysosomal alkalization and the bactericidal effect of antibiotics: the *Coxiella burnetii* paradigm." J Infect Dis **166**(5): 1097-1102.
- MEINHARDT, A. (2011). "Vergleich der Wirtszellantwort auf eine replikative und persistente *Chlamydia psittaci* Infektion". Bachelorarbeit, Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Jena.

- MISYURINA, O. Y., CHIPITSYNA, E. V., FINASHUTINA, Y. P., LAZAREV, V. N., AKOPIAN, T. A., SAVICHEVA, A. M. and GOVORUN, V. M. (2004). "Mutations in a 23S rRNA gene of *Chlamydia trachomatis* associated with resistance to macrolides." Antimicrob Agents Chemother **48**(4): 1347-1349.
- MIYASHITA, N., NIKI, Y., KISHIMOTO, T., NAKAJIMA, M. and MATSUSHIMA, T. (1997). "In vitro and in vivo activities of AM-1155, a new fluoroquinolone, against *Chlamydia* spp." Antimicrob Agents Chemother **41**(6): 1331-1334.
- MOELLEKEN, K. and HEGEMANN, J. H. (2008). "The *Chlamydia* outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding." Mol Microbiol **67**(2): 403-419.
- MÖHLE, K. (2011). "Wirts-Erreger-Interaktionen im Respirationstrakt von Kälbern nach experimenteller aerogener Infektion mit *Chlamydia psittaci*". Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- MOLESTINA, R. E., KLEIN, J. B., MILLER, R. D., PIERCE, W. H., RAMIREZ, J. A. and SUMMERSGILL, J. T. (2002). "Proteomic analysis of differentially expressed *Chlamydia pneumoniae* genes during persistent infection of Hep-2 cells." Infect Immun **70**(6): 2976-2981.
- MOLESTINA, R. E., MILLER, R. D., RAMIREZ, J. A. and SUMMERSGILL, J. T. (1999). "Infection of human endothelial cells with *Chlamydia pneumoniae* stimulates transendothelial migration of neutrophils and monocytes." Infect Immun **67**(3): 1323-1330.
- MORRISON, R. P. and CALDWELL, H. D. (2002). "Immunity to murine chlamydial genital infection." Infect Immun **70**(6): 2741-2751.
- MORRISSEY, I., SALMAN, H., BAKKER, S., FARRELL, D., BEBEAR, C. M. and RIDGWAY, G. (2002). "Serial passage of *Chlamydia* spp. in sub-inhibitory fluoroquinolone concentrations." J Antimicrob Chemother **49**(5): 757-761.
- MOULDER, J. W. (1991). "Interaction of chlamydiae and host cells in vitro." Microbiol Rev **55**(1): 143-190.
- MOULDER, J. W., LEVY, N. J. and SCHULMAN, L. P. (1980). "Persistent infection of mouse fibroblasts (L cells) with *Chlamydia psittaci*: evidence for a cryptic chlamydial form." Infect Immun **30**(3): 874-883.
- MPIGA, P. and RAVAOARINORO, M. (2006a). "*Chlamydia trachomatis* persistence: an update." Microbiol Res **161**(1): 9-19.
- MPIGA, P. and RAVAOARINORO, M. (2006b). "Effects of sustained antibiotic bactericidal treatment on *Chlamydia trachomatis*-infected epithelial-like cells (HeLa) and monocyte-like cells (THP-1 and U-937)." Int J Antimicrob Agents **27**(4): 316-324.
- MUKAIDA, N., HARADA, A. and MATSUSHIMA, K. (1998). "Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions." Cytokine Growth Factor Rev **9**(1): 9-23.
- MUKHOPADHYAY, S., MILLER, R. D., SULLIVAN, E. D., THEODOROPOULOS, C., MATHEWS, S. A., TIMMS, P. and SUMMERSGILL, J. T. (2006). "Protein expression profiles of *Chlamydia pneumoniae* in models of persistence versus those of heat shock stress response." Infect Immun **74**(7): 3853-3863.
- MÜLLER, N., SATTELMACHER, F., LUGERT, R. and GROß, U. (2008). "Characterization and intracellular localization of putative *Chlamydia pneumoniae* effector proteins." Medical Microbiology and Immunology **197**(4): 387-396.
- NICHOLSON, T. S. R. S. (2002). "Chlamydial genomic transcriptional profile for penicillin-induced persistence." In: Schachter J, Christiansen G, Clarke IN, et al., eds. Chlamydial infections. Proceedings of the Tenth International Symposium on Human Chlamydial Infections. San Francisco, CA: International Chlamydia Symposium: 611-614.

- NIKI, Y., KIMURA, M., MIYASHITA, N. and SOEJIMA, R. (1994). "In vitro and in vivo activities of azithromycin, a new azalide antibiotic, against chlamydia." Antimicrob Agents Chemother **38**(10): 2296-2299.
- NOTOMI, T., IKEDA, Y. and NAGAYAMA, A. (1999). "Minimum inhibitory and minimal lethal concentration against *Chlamydia trachomatis* dependent on the time of addition and the duration of the presence of antibiotics." Chemotherapy **45**(4): 242-248.
- NYSTROM-ROSANDER, C., HULTEN, K., GUSTAVSSON, I., CARS, O., ENGSTRAND, L. and HJELM, E. (1997). "Susceptibility of *Chlamydia pneumoniae* to azithromycin and doxycycline: methodological aspects on the determination of minimal inhibitory and minimal bactericidal concentrations." Scand J Infect Dis **29**(5): 513-516.
- OMSLAND, A., SIXT, B. S., HORN, M. and HACKSTADT, T. (2014). "Chlamydial metabolism revisited: interspecies metabolic variability and developmental stage-specific physiologic activities." FEMS Microbiol Rev **38**(4): 779-801.
- OSTERMANN, C., LINDE, S., SIEGLING-VLITAKIS, C. and REINHOLD, P. (2014). "Evaluation of pulmonary dysfunctions and acid-base imbalances induced by *Chlamydia psittaci* in a bovine model of respiratory infection." Multidisciplinary Respiratory Medicine **9**(1): 10.
- OSTERMANN, C., RUTTGER, A., SCHUBERT, E., SCHRODL, W., SACHSE, K. and REINHOLD, P. (2013a). "Infection, disease, and transmission dynamics in calves after experimental and natural challenge with a bovine *Chlamydia psittaci* isolate." PLoS One **8**(5): e64066.
- OSTERMANN, C., SCHROEDL, W., SCHUBERT, E., SACHSE, K. and REINHOLD, P. (2013b). "Dose-dependent effects of *Chlamydia psittaci* infection on pulmonary gas exchange, innate immunity and acute-phase reaction in a bovine respiratory model." Vet J **196**: 351 - 359.
- OUELLETTE, S. P., ABDELRAHMAN, Y. M., BELLAND, R. J. and BYRNE, G. I. (2005). "The *Chlamydia pneumoniae* type III secretion-related lcrH gene clusters are developmentally expressed operons." J Bacteriol **187**(22): 7853-7856.
- OUELLETTE, S. P., HATCH, T. P., ABDELRAHMAN, Y. M., ROSE, L. A., BELLAND, R. J. and BYRNE, G. I. (2006). "Global transcriptional upregulation in the absence of increased translation in *Chlamydia* during IFN γ -mediated host cell tryptophan starvation." Mol Microbiol **62**(5): 1387-1401.
- PANTOJA, L. G., MILLER, R. D., RAMIREZ, J. A., MOLESTINA, R. E. and SUMMERSGILL, J. T. (2000). "Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* replication in human aortic smooth muscle cells by gamma interferon-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase activity." Infect Immun **68**(11): 6478-6481.
- PAWLICZAK, R., LOGUN, C., MADARA, P., BARB, J., SUFFREDINI, A. F., MUNSON, P. J., DANNER, R. L. and SHELHAMER, J. H. (2005). "Influence of IFN- γ on gene expression in normal human bronchial epithelial cells: modulation of IFN- γ effects by dexamethasone." Physiol Genomics **23**(1): 28-45.
- PEELING, R. W. and BRUNHAM, R. C. (1996). "Chlamydiae as pathogens: new species and new issues." Emerg Infect Dis **2**(4): 307-319.
- PERFETTINI, J. L., HOSPITAL, V., STAHL, L., JUNGAS, T., VERBEKE, P. and OJCIUS, D. M. (2003). "Cell death and inflammation during infection with the obligate intracellular pathogen, *Chlamydia*." Biochimie **85**(8): 763-769.
- PETERS, J., HESS, S., ENDLICH, K., THALMANN, J., HOLZBERG, D., KRACHT, M., SCHAEFER, M., BARTLING, G. and KLOS, A. (2005). "Silencing or permanent activation: host-cell responses in models of persistent *Chlamydia pneumoniae* infection." Cell Microbiol **7**(8): 1099-1108.

- PLAUNT, M. R. and HATCH, T. P. (1988). "Protein synthesis early in the developmental cycle of *Chlamydia psittaci*." *Infect Immun* **56**(12): 3021-3025.
- POLKINGHORNE, A., HOGAN, R. J., VAUGHAN, L., SUMMERSGILL, J. T. and TIMMS, P. (2006). "Differential expression of chlamydial signal transduction genes in normal and interferon gamma-induced persistent *Chlamydia pneumoniae* infections." *Microbes Infect* **8**(1): 61-72.
- POSPISCHIL, A., BOREL, N., CHOWDHURY, E. H. and GUSCETTI, F. (2009). "Aberrant chlamydial developmental forms in the gastrointestinal tract of pigs spontaneously and experimentally infected with *Chlamydia suis*." *Vet Microbiol* **135**(1-2): 147-156.
- PROHL, A., LOHR, M., OSTERMANN, C., LIEBLER-TENORIO, E., BERNDT, A., SCHROEDL, W., ROTHE, M., SCHUBERT, E., SACHSE, K. and REINHOLD, P. (2015a). "Enrofloxacin and macrolides alone or in combination with rifampicin as antimicrobial treatment in a bovine model of acute *Chlamydia psittaci* infection." *PLoS One* **10**(3).
- PROHL, A., LOHR, M., OSTERMANN, C., LIEBLER-TENORIO, E., BERNDT, A., SCHROEDL, W., ROTHE, M., SCHUBERT, E., SACHSE, K. and REINHOLD, P. (2015b). "Evaluation of antimicrobial treatment in a bovine model of acute *Chlamydia psittaci* infection: tetracycline versus tetracycline plus rifampicin." *Pathog Dis* **73**(1): 1-12.
- PROHL, A., OSTERMANN, C., LOHR, M. and REINHOLD, P. (2014). "The Bovine Lung in Biomedical Research: Visually Guided Bronchoscopy, Intrabronchial Inoculation and In Vivo Sampling Techniques." *J Vis Exp*(89): e51557.
- PROHL, A., WOLF, K., WEBER, C., MÜLLER, K., MENGE, C., SACHSE, K., RÖDEL, J., REINHOLD, P. and BERNDT, A. (2015c). "Kinetics of local and systemic leucocyte and cytokine reaction of calves to intrabronchial infection with *Chlamydia psittaci*." *PLoS One* **10**(8): e0135161.
- PRUCKLER, J. M., MASSE, N., STEVENS, V. A., GANG, L., YANG, Y., ZELL, E. R., DOWELL, S. F. and FIELDS, B. S. (1999). "Optimizing culture of *Chlamydia pneumoniae* by using multiple centrifugations." *J Clin Microbiol* **37**(10): 3399-3401.
- RAHMAN, M. U., CHEEMA, M. A., SCHUMACHER, H. R. and HUDSON, A. P. (1992). "Molecular evidence for the presence of chlamydia in the synovium of patients with Reiter's syndrome." *Arthritis Rheum* **35**(5): 521-529.
- RANK, R. G., BOWLIN, A. K., TORMANEN, K. I., WANG, Y. and MAURELLI, A. T. (2012). "Effect of Inflammatory Response on In Vivo Competition between Two Chlamydial Variants in the Guinea Pig Model of Inclusion Conjunctivitis." *Infection and Immunity* **80**(2): 612-619.
- RASMUSSEN, S. J., ECKMANN, L., QUAYLE, A. J., SHEN, L., ZHANG, Y. X., ANDERSON, D. J., FIERER, J., STEPHENS, R. S. and KAGNOFF, M. F. (1997). "Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis." *J Clin Invest* **99**(1): 77-87.
- RAULSTON, J. E., DAVIS, C. H., SCHMIEL, D. H., MORGAN, M. W. and WYRICK, P. B. (1993). "Molecular characterization and outer membrane association of a *Chlamydia trachomatis* protein related to the hsp70 family of proteins." *J Biol Chem* **268**(31): 23139-23147.
- REINHOLD, P., OSTERMANN, C., LIEBLER-TENORIO, E., BERNDT, A., VOGEL, A., LAMBERTZ, J., ROTHE, M., RUTTGER, A., SCHUBERT, E. and SACHSE, K. (2012). "A bovine model of respiratory *Chlamydia psittaci* infection: challenge dose titration." *PLoS One* **7**: e30125.
- REVENEAU, N., CRANE, D. D., FISCHER, E. and CALDWELL, H. D. (2005). "Bactericidal activity of first-choice antibiotics against gamma interferon-induced persistent infection of human epithelial cells by *Chlamydia trachomatis*." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(5): 1787-1793.
- RIDGWAY, G. L., OWEN, J. M. and ORIEL, J. D. (1978). "The antimicrobial susceptibility of *Chlamydia trachomatis* in cell culture." *Br J Vener Dis* **54**(2): 103-106.

- RIZZO, A., DOMENICO, M. D., CARRATELLI, C. R. and PAOLILLO, R. (2012). "The role of Chlamydia and Chlamydophila infections in reactive arthritis." Intern Med **51**(1): 113-117.
- RODEL, J., GROH, A., VOGELSANG, H., LEHMANN, M., HARTMANN, M. and STRAUBE, E. (1998). "Beta interferon is produced by Chlamydia trachomatis-infected fibroblast-like synoviocytes and inhibits gamma interferon-induced HLA-DR expression." Infect Immun **66**(9): 4491-4495.
- RODEL, J., GROSSE, C., YU, H., WOLF, K., OTTO, G. P., LIEBLER-TENORIO, E., FORSBACH-BIRK, V. and STRAUBE, E. (2012). "Persistent Chlamydia trachomatis infection of HeLa cells mediates apoptosis resistance through a Chlamydia protease-like activity factor-independent mechanism and induces high mobility group box 1 release." Infect Immun **80**(1): 195-205.
- ROHDE, G., STRAUBE, E., ESSIG, A., REINHOLD, P. and SACHSE, K. (2010). "Chlamydial zoonoses." Dtsch Arztebl Int **107**(10): 174-180.
- ROTHERMEL, C. D., RUBIN, B. Y. and MURRAY, H. W. (1983). "Gamma-interferon is the factor in lymphokine that activates human macrophages to inhibit intracellular Chlamydia psittaci replication." J Immunol **131**(5): 2542-2544.
- RUPP, J., GEBERT, A., SOLBACH, W. and MAASS, M. (2005). "Serine-to-asparagine substitution in the GyrA gene leads to quinolone resistance in moxifloxacin-exposed Chlamydia pneumoniae." Antimicrob Agents Chemother **49**(1): 406-407.
- SACHSE, K., BAVOIL, P. M., KALTENBOECK, B., STEPHENS, R. S., KUO, C. C., ROSSELLO-MORA, R. and HORN, M. (2015). "Emendation of the family Chlamydiaceae: Proposal of a single genus, Chlamydia, to include all currently recognized species." Syst Appl Microbiol **38**(2): 99-103.
- SACHSE, K., HOTZEL, H., SLICKERS, P., ELLINGER, T. and EHRLICH, R. (2005). "DNA microarray-based detection and identification of Chlamydia and Chlamydophila spp." Mol Cell Probes **19**(1): 41-50.
- SACHSE, K., LAROUCAU, K., RIEGE, K., WEHNER, S., DILCHER, M., CREASY, H. H., WEIDMANN, M., MYERS, G., VORIMORE, F., VICARI, N., MAGNINO, S., LIEBLER-TENORIO, E., RUETTGER, A., BAVOIL, P. M., HUFERT, F. T., ROSSELLO-MORA, R. and MARZ, M. (2014). "Evidence for the existence of two new members of the family Chlamydiaceae and proposal of Chlamydia avium sp. nov. and Chlamydia gallinacea sp. nov." Syst Appl Microbiol **37**(2): 79-88.
- SACHSE, K., LAROUCAU, K., VORIMORE, F., MAGNINO, S., FEIGE, J., MULLER, W., KUBE, S., HOTZEL, H., SCHUBERT, E., SLICKERS, P. and EHRLICH, R. (2009a). "DNA microarray-based genotyping of Chlamydophila psittaci strains from culture and clinical samples." Vet Microbiol **135**(1-2): 22-30.
- SACHSE, K., VRETOU, E., LIVINGSTONE, M., BOREL, N., POSPISCHIL, A. and LONGBOTTOM, D. (2009b). "Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections." Vet Microbiol **135**(1-2): 2-21.
- SAMRA, Z., ROSENBERG, S., SOFFER, Y. and DAN, M. (2001). "In vitro susceptibility of recent clinical isolates of Chlamydia trachomatis to macrolides and tetracyclines." Diagn Microbiol Infect Dis **39**(3): 177-179.
- SANDOZ, K. M. and ROCKEY, D. D. (2010). "Antibiotic resistance in Chlamydiae." Future Microbiol **5**(9): 1427-1442.
- SANGER, F., NICKLEN, S. and COULSON, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.

- SCHACHTER, J., STEPHENS, R. S., TIMMS, P., KUO, C., BAVOIL, P. M., BIRKELUND, S., BOMAN, J., CALDWELL, H., CAMPBELL, L. A., CHERNESKY, M., CHRISTIANSEN, G., CLARKE, I. N., GAYDOS, C., GRAYSTON, J. T., HACKSTADT, T., HSIA, R., KALTENBOECK, B., LEINONNEN, M., OJCIUS, D., MCCLARTY, G., ORFILA, J., PEELING, R., PUOLAKKAINEN, M., QUINN, T. C., RANK, R. G., RAULSTON, J., RIDGEWAY, G. L., SAIKKU, P., STAMM, W. E., TAYLOR-ROBINSON, D. T., WANG, S. P. and WYRICK, P. B. (2001). "Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet." Int J Syst Evol Microbiol **51**(Pt 1): 249; author reply 251-243.
- SCHAUTTEET, K., DE CLERCQ, E., MIRY, C., VAN GROENWEGHE, F., DELAVA, P., KALMAR, I. and VANROMPAY, D. (2013). "Tetracycline-resistant Chlamydia suis in cases of reproductive failure on Belgian, Cypriot and Israeli pig production farms." J Med Microbiol **62**(Pt 2): 331-334.
- SCHOBORG, R. V. (2011). "Chlamydia persistence -- a tool to dissect chlamydia--host interactions." Microbes Infect **13**(7): 649-662.
- SCHOFL, G., VOIGT, A., LITSCHKE, K., SACHSE, K. and SALUZ, H. P. (2011). "Complete genome sequences of four mammalian isolates of Chlamydomonas psittaci." J Bacteriol **193**(16): 4258.
- SCIDMORE, M. A., ROCKEY, D. D., FISCHER, E. R., HEINZEN, R. A. and HACKSTADT, T. (1996). "Vesicular interactions of the Chlamydia trachomatis inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry." Infect Immun **64**(12): 5366-5372.
- SENN, L., HAMMERSCHLAG, M. R. and GREUB, G. (2005). "Therapeutic approaches to Chlamydia infections." Expert Opin Pharmacother **6**(13): 2281-2290.
- SHEMER, Y. and SAROV, I. (1985). "Inhibition of growth of Chlamydia trachomatis by human gamma interferon." Infect Immun **48**(2): 592-596.
- SIEWERT, K., RUPP, J., KLINGER, M., SOLBACH, W. and GIEFFERS, J. (2005). "Growth cycle-dependent pharmacodynamics of antichlamydial drugs." Antimicrob Agents Chemother **49**(5): 1852-1856.
- SLEPENKIN, A., MOTIN, V., DE LA MAZA, L. M. and PETERSON, E. M. (2003). "Temporal expression of type III secretion genes of Chlamydia pneumoniae." Infect Immun **71**(5): 2555-2562.
- SMITH, A., MUNOZ, B., HSIEH, Y. H., BOBO, L., MKOCHA, H. and WEST, S. (2001). "OmpA genotypic evidence for persistent ocular Chlamydia trachomatis infection in Tanzanian village women." Ophthalmic Epidemiol **8**(2-3): 127-135.
- SMITH, R. P., BALTCH, A. L., RITZ, W. J., CARPENTER, A. N., HALSE, T. A. and BOPP, L. H. (2004). "In vitro activities of garenoxacin and levofloxacin against Chlamydia pneumoniae are not affected by presence of Mycoplasma DNA." Antimicrob Agents Chemother **48**(6): 2081-2084.
- SOMANI, J., BHULLAR, V. B., WORKOWSKI, K. A., FARSHY, C. E. and BLACK, C. M. (2000). "Multiple drug-resistant Chlamydia trachomatis associated with clinical treatment failure." J Infect Dis **181**(4): 1421-1427.
- STEPHENS, R. S. (2003). "The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis." Trends Microbiol **11**(1): 44-51.
- STEPHENS, R. S., KOSHIYAMA, K., LEWIS, E. and KUBO, A. (2001). "Heparin-binding outer membrane protein of chlamydiae." Mol Microbiol **40**(3): 691-699.
- SUCHLAND, R. J., GEISLER, W. M. and STAMM, W. E. (2003). "Methodologies and cell lines used for antimicrobial susceptibility testing of Chlamydia spp." Antimicrob Agents Chemother **47**(2): 636-642.
- SUCHLAND, R. J., SANDOZ, K. M., JEFFREY, B. M., STAMM, W. E. and ROCKEY, D. D. (2009). "Horizontal transfer of tetracycline resistance among Chlamydia spp. in vitro." Antimicrob Agents Chemother **53**(11): 4604-4611.

- SUMMERSGILL, J. T., SAHNEY, N. N., GAYDOS, C. A., QUINN, T. C. and RAMIREZ, J. A. (1995). "Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* growth in HEp-2 cells pretreated with gamma interferon and tumor necrosis factor alpha." Infect Immun **63**(7): 2801-2803.
- SWOBODA, S., OBERDORFER, K., KLEE, F., HOPPE-TICHY, T., VON BAUM, H. and GEISS, H. K. (2003). "Tissue and serum concentrations of levofloxacin 500 mg administered intravenously or orally for antibiotic prophylaxis in biliary surgery." J Antimicrob Chemother **51**(2): 459-462.
- TAMURA, A., MATSUMOTO, A. and HIGASHI, N. (1967). "Purification and chemical composition of reticulate bodies of the meningopneumonitis organisms." J Bacteriol **93**(6): 2003-2008.
- TAYLOR, H. R. (2002). "Flies and trachoma." Clin Experiment Ophthalmol **30**(2): 65-65.
- TAYLOR, M. W. and FENG, G. S. (1991). "Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism." FASEB J **5**(11): 2516-2522.
- TENSON, T., LOVMAR, M. and EHRENBERG, M. (2003). "The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome." J Mol Biol **330**(5): 1005-1014.
- THEEGARTEN, D., ANHENN, O., HOTZEL, H., WAGNER, M., MARRA, A., STAMATIS, G., MOGILEVSKI, G. and SACHSE, K. (2004). "A comparative ultrastructural and molecular biological study on *Chlamydia psittaci* infection in alpha-1 antitrypsin deficiency and non-alpha-1 antitrypsin deficiency emphysema versus lung tissue of patients with hamartochondroma." BMC Infect Dis **4**: 38.
- THEEGARTEN, D., SACHSE, K., MENTRUP, B., FEY, K., HOTZEL, H. and ANHENN, O. (2008). "*Chlamydophila* spp. infection in horses with recurrent airway obstruction: similarities to human chronic obstructive disease." Respir Res **9**: 14.
- THORNSBERRY, C., HILL, B. C., SWENSON, J. M. and MCDUGAL, L. K. (1983). "Rifampin: spectrum of antibacterial activity." Rev Infect Dis **5 Suppl 3**: S412-417.
- TIMMS, P., GOOD, D., WAN, C., THEODOROPOULOS, C., MUKHOPADHYAY, S., SUMMERSGILL, J. and MATHEWS, S. (2009). "Differential transcriptional responses between the interferon-gamma-induction and iron-limitation models of persistence for *Chlamydia pneumoniae*." J Microbiol Immunol Infect **42**(1): 27-37.
- TRIBBY, II, FRIIS, R. R. and MOULDER, J. W. (1973). "Effect of chloramphenicol, rifampicin, and nalidixic acid on *Chlamydia psittaci* growing in L cells." J Infect Dis **127**(2): 155-163.
- VAN BAMBEKE, F., MICHOT, J. M., VAN ELDERE, J. and TULKENS, P. M. (2005). "Quinolones in 2005: an update." Clin Microbiol Infect **11**(4): 256-280.
- VAN BAMBEKE, F. and TULKENS, P. M. (2001). "Macrolides: pharmacokinetics and pharmacodynamics." Int J Antimicrob Agents **18 Suppl 1**: S17-23.
- VANROMPAY, D., DUCATELLE, R. and HAESBROUCK, F. (1992). "Diagnosis of avian chlamydiosis: specificity of the modified Gimenez staining on smears and comparison of the sensitivity of isolation in eggs and three different cell cultures." Zentralbl Veterinarmed B **39**(2): 105-112.
- VINAY, D. S. and KWON, B. S. (1998). "Role of 4-1BB in immune responses." Semin Immunol **10**(6): 481-489.
- VORIMORE, F., HSIA, R. C., HUOT-CREASY, H., BASTIAN, S., DERUYTER, L., PASSET, A., SACHSE, K., BAVOIL, P., MYERS, G. and LAROUCAU, K. (2013). "Isolation of a New *Chlamydia* species from the Feral Sacred Ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis*." PLoS One **8**(9): e74823.

- WALTER, S., TRELOAR, E. and BAHL, R. (2014). "PMM.32 Chlamydia Psittaci: an Unusual but Preventable Cause of Sepsis in Pregnancy." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **99 Suppl 1**: A133.
- WANG, S. A., PAPP, J. R., STAMM, W. E., PEELING, R. W., MARTIN, D. H. and HOLMES, K. K. (2005). "Evaluation of antimicrobial resistance and treatment failures for Chlamydia trachomatis: a meeting report." J Infect Dis **191**(6): 917-923.
- WEHRLI, W. (1983). "Rifampin: mechanisms of action and resistance." Rev Infect Dis **5 Suppl 3**: S407-411.
- WEISS, E. and DRESSLER, H. R. (1960). "Centrifugation and Rickettsiae and viruses onto cells and its effect on infection." Proc Soc Exp Biol Med **103**: 691-695.
- WERNER-FELMAYER, G., WERNER, E. R., FUCHS, D., HAUSEN, A., REIBNEGGER, G. and WACHTER, H. (1989). "Characteristics of interferon induced tryptophan metabolism in human cells in vitro." Biochim Biophys Acta **1012**(2): 140-147.
- WHITTINGTON, W. L., KENT, C., KISSINGER, P., OH, M. K., FORTENBERRY, J. D., HILLIS, S. E., LITCHFIELD, B., BOLAN, G. A., ST LOUIS, M. E., FARLEY, T. A. and HANDSFIELD, H. H. (2001). "Determinants of persistent and recurrent Chlamydia trachomatis infection in young women: results of a multicenter cohort study." Sex Transm Dis **28**(2): 117-123.
- WOLF, K. and MALINVERNI, R. (1999). "Effect of azithromycin plus rifampin versus that of azithromycin alone on the eradication of Chlamydia pneumoniae from lung tissue in experimental pneumonitis." Antimicrob Agents Chemother **43**(6): 1491-1493.
- WRIGHT, H. R., TURNER, A. and TAYLOR, H. R. (2008). "Trachoma." Lancet **371**(9628): 1945-1954.
- WYRICK, P. B. (2000). "Intracellular survival by Chlamydia." Cell Microbiol **2**(4): 275-282.
- WYRICK, P. B. (2010). "Chlamydia trachomatis persistence in vitro: an overview." J Infect Dis **201 Suppl 2**: S88-95.
- WYRICK, P. B. and BROWNRIDGE, E. A. (1978). "Growth of Chlamydia psittaci in macrophages." Infect Immun **19**(3): 1054-1060.
- WYRICK, P. B. and KNIGHT, S. T. (2004). "Pre-exposure of infected human endometrial epithelial cells to penicillin in vitro renders Chlamydia trachomatis refractory to azithromycin." J Antimicrob Chemother **54**(1): 79-85.
- XUE, M. L., ZHU, H., THAKUR, A. and WILLCOX, M. (2002). "1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human corneal epithelial cells colonized with Pseudomonas aeruginosa." Immunol Cell Biol **80**(4): 340-345.
- YANG, J., HOOPER, W. C., PHILLIPS, D. J., TONDELLA, M. L. and TALKINGTON, D. F. (2003). "Induction of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells during Chlamydia pneumoniae infection." Infect Immun **71**(2): 614-620.
- YANG, Y. S., KUO, C. C. and CHEN, W. J. (1983). "Reactivation of Chlamydia trachomatis lung infection in mice by cortisone." Infect Immun **39**(2): 655-658.
- YOKOI, S., YASUDA, M., ITO, S., TAKAHASHI, Y., ISHIHARA, S., DEGUCHI, T., MAEDA, S., KUBOTA, Y., TAMAKI, M. and FUKUSHI, H. (2004). "Uncommon occurrence of fluoroquinolone resistance-associated alterations in GyrA and ParC in clinical strains of Chlamydia trachomatis." J Infect Chemother **10**(5): 262-267.
- YU, H., SCHWARZER, K., FÖRSTER, M., KNIEMEYER, O., FORSBACH-BIRK, V., STRAUPE, E. and RÖDEL, J. (2010). "Role of High-Mobility Group Box 1 Protein and Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Degradation in Chlamydia trachomatis-Induced Cytopathicity." Infection and Immunity **78**(7): 3288-3297.

- ZAROGOULIDIS, P., PAPANAS, N., KIOUMIS, I., CHATZAKI, E., MALTEZOS, E. and ZAROGOULIDIS, K. (2012). "Macrolides: from in vitro anti-inflammatory and immunomodulatory properties to clinical practice in respiratory diseases." Eur J Clin Pharmacol **68**(5): 479-503.
- ZHANEL, G. G., ENNIS, K., VERCAIGNE, L., WALKTY, A., GIN, A. S., EMBIL, J., SMITH, H. and HOBAN, D. J. (2002). "A critical review of the fluoroquinolones: focus on respiratory infections." Drugs **62**(1): 13-59.
- ZHONG, G. (2011). "Chlamydia trachomatis secretion of proteases for manipulating host signaling pathways." Front Microbiol **2**: 14.
- ZHU, H., WANG, H. P., JIANG, Y., HOU, S. P., LIU, Y. J. and LIU, Q. Z. (2010). "Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in Chlamydia trachomatis strains selected in vitro by macrolide passage." Andrologia **42**(4): 274-280.

7 Danksagung

Ich möchte Herrn Professor Dr. Eberhard Straube dafür danken, dass er mir die Möglichkeit eröffnet hat, meine Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Jena anzufertigen. Dadurch wurde es mir ermöglicht, ein interessantes und medizinisch relevantes Thema zu bearbeiten. Ich bedanke mich weiterhin für die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Herrn PD Dr. Jürgen Rödel möchte ich meinen größten Dank aussprechen. Neben der Bereitstellung des Promotionsthemas war er immer zu konstruktiven Diskussionen bereit. Des Weiteren hat er mich bei Tagungsvorbereitungen und der Erstellung dieser Arbeit sehr unterstützt und es mir darüber hinaus ermöglicht, wertvolle Einblicke in die diagnostische Arbeit des Instituts sowie die Betreuung von Studenten zu erlangen.

Frau Professor Dr. Bettina Löffler danke ich für ihr Interesse an dieser Arbeit.

Frau Professor Dr. Petra Reinhold vom Friedrich- Loeffler- Institut Jena danke ich, da sie es mir ermöglicht hat, an einem umfangreichen Tierversuch teilnehmen zu können. Ihren Mitarbeitern, insbesondere Annette Prohl, Dr. Carola Ostermann, Markus Lohr und Annelie Langenberg, möchte ich für die Organisation und unkomplizierte Übergabe der Probenmaterialien danken.

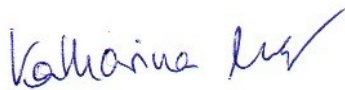
Allen Kolleginnen und Kollegen der Medizinischen Mikrobiologie gilt mein Dank für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Insbesondere Dr. Svea Sachse und Dr. Beate Hermann danke ich für viele fachliche Diskussionen und freundschaftliche Gespräche und manches offene Ohr. Auch meinen ehemaligen Kolleginnen Christina Große, Hangxing Yu, Katharina Boden und Katja Schwarzer möchte ich für die Aufnahme ins Team und eine schöne Zeit, auch außerhalb des Instituts, danken. Nicht unerwähnt bleiben sollen David, Anne, Saskia, Steffi, Laura, Lydia und Christoph und die anderen Studenten, welche den Laboralltag aufgefrischt – und aufgemischt – haben.

Bei Yvonne, Constance und vor allem Martin möchte ich mich für ihre Unterstützung und Freundschaft bedanken. Ebenso wie bei den vielen anderen Freunden, die ich vor und während meiner Zeit in der „Mibi“ kennengelernt habe und die mir manches Mal den nötigen Motivationsschub gegeben haben.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Partner André sowie meinen Eltern, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt, mir Kraft und Motivation gegeben und mir den Rücken freigehalten haben.

8 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Katharina Wolf, geboren am 03.10.1982 in Eisenach, dass
mir die Promotionsordnung der Biologisch- Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-
Schiller- Universität Jena bekannt ist,
ich die Dissertation mit dem Thema „Wirksamkeit von Antibiotika gegenüber replikativen
und persistenten Formen von *Chlamydia psittaci*“ selbst angefertigt habe und alle von mir
benutzten Hilfsmittel und Quellen in der Arbeit angegeben sind,
alle Personen in der Danksagung genannt werden, die mich bei Auswahl und Auswertung
des Materials sowie der Anfertigung des Manuskripts unterstützt haben,
die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und, dass Dritte
weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten
haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere
wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,
ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht
bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.



Katharina Wolf

Erfurt, im November 2015

9 Veröffentlichungen

9.1 Publikationen

RODEL, J., GROSSE, C., YU, H., **WOLF, K.**, OTTO, G. P., LIEBLER-TENORIO, E., FORSBACH-BIRK, V. and STRAUBE, E. (2012). "Persistent *Chlamydia trachomatis* infection of HeLa cells mediates apoptosis resistance through a *Chlamydia* protease-like activity factor-independent mechanism and induces high mobility group box 1 release." *Infect Immun* **80**(1): 195-205.

BODEN, K., **WOLF, K.**, HERMANN, B. and FRANGOULIDIS, D. (2015). "First isolation of *Coxiella burnetii* from clinical material by cell free medium (ACCM2)." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **34**(5): 1017-22.

PROHL, A., **WOLF, K.**, WEBER, C., MÜLLER, K., MENGE, C., SACHSE, K., RÖDEL, J., REINHOLD, P. and BERNDT, A. (2015). "Kinetics of local and systemic leucocyte and cytokine reaction of calves to intrabronchial infection with *Chlamydia psittaci*." *PLoS One* **10**(8):e0135161.

SCHRÖDER, U.-C., BOKELOH, F., O'SULLIVAN, M., GLASER, U., **WOLF, K.**, PFISTER, W., POPP, J., DUCRÉE, J. and NEUGEBAUER, U. (2015). "Rapid, culture-independent, optical diagnostics of centrifugally captured bacteria from urine samples." *Biomicrofluidics* **9**(4): 0441118.

9.2 Mündliche Tagungsbeiträge

3. Treffen des BMBF- Verbundes "Zoonotische Chlamydien", Jena, 05/ 2009

„Persistente Chlamydieninfektionen – Neue Ansätze einer antibiotischen Therapie“

K. Wolf, J. Rödel, E. Straube

National Symposium on Zoonoses Research, Berlin, 10/ 2010

„Approaches to the antimicrobial treatment of persistent *Chlamydia psittaci* infections“

K. Wolf, J. Rödel, E. Straube

6. Treffen des BMBF- Verbundes "Zoonotische Chlamydien – Modelle für chronische und persistente Infektionen bei Mensch und Tier", Dornburg, Jena, 05/ 2011

„Untersuchungen zur Wirksamkeit von Antibiotika gegen persistente *C. psittaci*- Infektionen in einem Zellkulturmodell“

K. Wolf, E. Straube, J. Rödel

10. Deutscher Chlamydienworkshop, Erfurt, 04/ 2012

„Differential host gene expression in response to antimicrobial treatment of persistent *Chlamydia psittaci*“

K. Wolf, A. Meinhardt, E. Straube, J. Rödel

National Symposium on Zoonoses Research, Berlin, 10/ 2012

„Modulation of host gene expression upon antimicrobial treatment of persistent *Chlamydia psittaci*”

K. Wolf, A. Meinhardt, E. Straube, J. Rödel

Second European Meeting on Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications (EMAC-2), Jena, 06/ 2013

“From cell culture to the animal model: host gene expression upon antimicrobial treatment of *Chlamydia psittaci* infections”

K. Wolf, S. Lindner, A. Meinhardt, C. Ostermann, A. Prohl, E. Straube, J. Rödel

9.3 Posterbeiträge

Nationales Symposium für Zoonosenforschung, Berlin, 10/ 2009

„Persistent chlamydiae: approaches to antibiotic treatment“

(„Persistente Chlamydien: Ansätze einer antibiotischen Therapie“)

K. Wolf, J. Rödel, E. Straube

8. Deutscher Chlamydienworkshop, Herrsching bei München, 02/ 2010

„Persistent chlamydiae: approaches to antibiotic treatment“

K. Wolf, J. Rödel, E. Straube

Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“ (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.), Jena, 06/ 2010

„Persistent chlamydiae: approaches to antibiotic treatment“

K. Wolf, J. Rödel, E. Straube

9. Deutscher Chlamydienworkshop, Ascona, Schweiz, 02/ 2011

„Approaches to the antimicrobial treatment of persistent *Chlamydophila psittaci* infections“

K. Wolf, J. Rödel, E. Straube

National Symposium on Zoonoses Research, Berlin, 10/ 2011

„Impaired response of persistent *Chlamydia psittaci* to antimicrobials“

K. Wolf, E. Straube, J. Rödel

National Symposium on Zoonoses Research, Berlin, 09/ 2013

„Host gene expression upon antimicrobial treatment of *Chlamydia psittaci* infections *in vitro* and *in vivo*“

K. Wolf, S. Lindner, A. Meinhardt, A. Prohl, C. Ostermann, M. Lohr, P. Reinhold, E. Straube, J. Rödel

10 Anhang

10.1 Material

10.1.1 Geräte und Laborausstattung

Gerät	Hersteller
Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer	life technologies, Darmstadt, D
Axio Observer.Z1 und LSM 5 Exciter	Zeiss, Jena, D
Biometra® TRIO- Thermoblock™ + TRIO Heated Lid	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, D
Branson Sonifier 250	BRANSON Ultraschall, Dietzenbach, D
DNA SpeedVac® DNA 110	Savant Instruments, Inc., Farmingdale, USA
Epifluoreszenzmikroskop Axioskop	Zeiss, Jena, D
Geldokumentation ImageMaster® VDS	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Inverses Lichtmikroskop Nikon TMS	Nikon, Japan
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Orbitalschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
pH- Meter pH523	WTW Wissenschaftlich- Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, D
PowerPac 200 Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Primus 25 advanced PCR- Gerät	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Schüttelinkubator	Edmund Bühler GmbH, Tübingen, D
SmartCycler II	Cepheid, Maurens- Scopont, Frankreich
Vakuumpumpe	INTEGRA Biosciences, Fernwald, D
Wide Mini-Sub® Cell GT System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Zentrifugen Rotanta 96 RSC und 460 RS	Hettich, Tuttlingen, D

10.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser rund, ø 12 mm	Menzel-Gläser, über Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, D
Deckglasröhrchen	Sterilin® Limited, über Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, D
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate und Plate Septa, 96 well, für Sequenzierung	Applied Biosystems®, über life technologies, Darmstadt, D
SmartCycler® Tubes	Cepheid, Sunnyvale, USA, über PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Zellkulturflaschen, Zellkulturplatten	Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen, D
Zellschaber	Nunc*, über Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, D

10.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
(D+) Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
1% ige Ethidiumbromid- Lösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Agar-Agar	Merck KGaA, Darmstadt, D
Agarose	Promega Corporation, Madison, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
DEPC- Wasser	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Entellan [®] (Schnelleindeckmedium)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol	AnalaR NORMAPUR, VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
LB Broth Base, Puder	Invitrogen [™] , Darmstadt, D
Methanol	AnalaR NORMAPUR, VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Mounting Fluid ProLong [®] Gold antifade reagent with DAPI	Invitrogen [™] , Darmstadt, D
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Orange G	Sigma Aldrich Chemie, München, D
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich Chemie, München, D
Phenolrot- Natriumsalz	Sigma Aldrich Chemie, München, D
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Saponin	BioChemika, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

10.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

Medien	Zusammensetzung/ Hersteller
DMEM Flüssigmedium mit stabilem Glutamin, mit 3,7 g/ L NaHCO ₃ , mit 4,5 g/ L Glucose	Biochrom AG, Berlin, D
Fetales Kälberserum (FCS)	RELIATech GmbH, Wolfenbüttel, D
LB- Agar	20 g LB Broth Base, 12 g Agar-Agar, 1 l A. dest., autoklavieren
LB- Medium	20 g LB Broth Base, 1 l A. dest., autoklavieren
Medium A	1000 ml PBS, 10 ml Phenolrot (0,2 g Phenolrot in 5,6 ml 1 N NaOH lösen, auf 100 ml mit A. dest. auffüllen), 68,5 g Saccharose, 20 ml FCS
Opti-MEM [®] I Reduced Serum Medium, GlutaMAX [™]	Gibco [®] , über life technologies, Darmstadt, D

Puffer	Zusammensetzung/ Hersteller
50 x TAE- Puffer	Thermo Scientific, Vilnius, Litauen
Blockpuffer für LSM- Präparate	3 % Bovines Serum Albumin in Waschpuffer
Orange G Ladepuffer für Agarosegelelektrophorese	10 ml H ₂ O, 10 ml Glycerin, 0,5% Orange G (100 mg/ 20 ml), 25 mM EDTA (186 mg/ 20 ml)
Phosphate buffered saline (PBS; 1 x)	Gibco [®] , über life technologies, Darmstadt, D
Waschpuffer für LSM- Präparate	0,1 % Saponin in 1 x PBS

Lösung	Zusammensetzung
2% Paraformaldehyd	2 g unter Erwärmen in 100 ml 1 x PBS lösen, für eine klare Lösung 2 – 3 Tropfen 1 M NaOH zugeben, abkühlen lassen und mit 1 M HCl auf pH 7.4 einstellen

10.1.5 Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Hersteller
Ampicillin Natriumsalz	H ₂ O	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Doxycyclin hyclate	H ₂ O	Sigma, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Enrofloxacin	1N NaOH	Fluka, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Erythromycin	Ethanol absolut	Sigma, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Kanamycin	H ₂ O	Boehringer Mannheim GmbH, D
Levofloxacin	1N NaOH	Fluka, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

Antibiotikum	Lösungsmittel	Hersteller
Ofloxacin	1N NaOH	Sigma, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Rifampicin	DMSO	Sigma, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Roxithromycin	Ethanol absolut	Sigma, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

10.1.6 Kits

Kit	Hersteller
BigDye [®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems [®] , über life technologies, Darmstadt, D
Hi-Di Formamid	Applied Biosystems [®] , über life technologies, Darmstadt, D
KAPA [™] SYBR [®] FAST QPCR MasterMix Universal	KAPABIOSYSTEMS, Boston, USA, über PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D

Kit	Hersteller
peqGOLD DNase I Digest Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
peqGOLD Gel Extraction Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I und II	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
peqGOLD Tissue DNA Mini Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
peqGOLD Total RNA Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Reverse Transcription System (AMV Reverse Transcriptase)	Promega Corporation, Madison, USA
TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen [™] , Darmstadt, D

10.1.7 Antikörper, Enzyme und Zytokine

Antikörper	Hersteller
IMAGEN [™] Chlamydia (FITC- konjugiert, monoklonal, gegen chlamydiales LPS)	Oxoid (Ely) Ltd, Ely, UK

Zytokin	Hersteller
rekombinantes humanes IFN γ , 20 units/ μ g	RELIA <i>Tech</i> GmbH, Wolfenbüttel, D

Enzym	Hersteller
GoTaq [®] DNA Polymerase	Promega Corporation, Madison, USA

10.1.8 DNA- Marker, Nukleotide und Primer

DNA- Marker	Herkunft
AmpliSize [™] Molecular Ruler, 50-2.000 bp	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D

Nukleotide	Herkunft
dNTP- Mix (je 10 mM)	Promega Corporation, Madison, USA

Primer	Herkunft
Primer für chlamydiale, humane u. bovine Gene Sequenzen, Annealingtemperaturen, Fragmentlängen etc. siehe Anhang, Kapitel 11.2	Jena Bioscience GmbH, Jena, D

10.1.9 Software

Software	Hersteller
EndNote	Thomson Reuters Corporation, USA
Microsoft Excel	
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word	
SmartCycler Dx Software	Cepheid, Maurens- Scopont, Frankreich
SPSS	IBM Corporation, Armonk, USA
ZEN Software 2009	Zeiss, Jena, Deutschland

10.2 Primer

Tabelle 16: Primerpaare für chlamydiale Gene mit angewendeter Konzentration, Annealingtemperatur, Zyklenzahl und erwarteter Fragmentlänge

Gen	Primer fwd (5' → 3') Primer rev (5' → 3')	c [nM]	T [°C]	Z.	L [bp]	Quelle
<i>16S rRNA</i> (prozessiert)	cggtataacggagggtgcta ctacgcatttcaccgtaca	200	55	35	176	(RODEL <i>et al.</i> 2012)
<i>16S rRNA</i> (unproz.)	ctgttacacaccgccgctc gcccaacctagtcacaccgctc	200	59	45	201	(GOELLNER <i>et al.</i> 2006)
<i>amiB</i>	ttgagcacaaaaccctagcc tcgggagaagttccatcaac	200	55	45	175	Primer3
<i>amn</i>	accacgtatttgcagaagc ccacacatgcccaagcataac	200	55	45	188	Primer3
<i>cHtrA</i>	ccttatctgctggtgaccct atagatgctgaattggcggc	200	59	45	91	Primer- BLAST
<i>cpaf</i>	cgcaccctgagcatcgta aagacaaaacccccagctcct	200	55	45	151	(GOELLNER <i>et al.</i> 2006)
<i>ftsW</i>	ttgttcctgcgtcgctatc aaaagctattacggctgcgga	200	55	45	152	(GOELLNER <i>et al.</i> 2006)
<i>glgP</i>	tatttctgaggggcaagagc tcatatcccaagcggatatcc	200	55	45	227	Primer3
<i>groEL</i>	caacaggtagcagaatccgga ctcttcgctgataagttggcaa	200	55	45	201	(GOELLNER <i>et al.</i> 2006)
<i>gyrA</i>	gcgaagcatcgtaaattgtc agccgaagttccttgaccat	200	55	45	151	(GOELLNER <i>et al.</i> 2006)
<i>ompA</i>	tgctgatagcatcacaccaag cattattgtttgccgctacg	200	55	45	156	Primer3
<i>pgk</i>	gttgctcgtcaggcagtagc acggaggcatgtttctgtg	200	59	45	182	Primer3
<i>rpoA</i>	ttgaagaagccatttctctg gaggctctggcataatcacc	200	59	45	159	Primer3
<i>sctN</i>	tggtctgggagaacctatcg tctggcgactgtgagcatac	200	55	45	166	Primer3
<i>Tsp</i>	tgacgtacacagagttgggt ggcagcggtcattactctc	200	55	45	106	Primer- BLAST

c = eingesetzte Primerkonzentration, T = Annealingtemperatur, Z. = Zyklenzahl

L = erwartete Fragmentlänge

Tabelle 17: Primerpaare für humane Gene mit angewendeter Konzentration, Annealingtemperatur, Zyklenzahl und erwarteter Fragmentlänge

Gen	Primer fwd (5' → 3') Primer rev (5' → 3')	c [nM]	T [°C]	Z.	L [bp]	Quelle
<i>CD55</i>	gtgaaccaggggtgtgatg gaagacacctttcacaggct	200	55	35	107	Primer- BLAST
<i>CDC2</i>	ttctttcgcgctctagccacc ttaccaatcggttagcccg	100	63	50	94	(MEINHARDT 2011)
<i>CXCL5</i>	gaccagagagagcttggaatg gtgagtggggagggaactt	200	55	30	220	Primer- BLAST
<i>GAPDH</i>	tcaagtggggcgatgctggc tgggggcatcagcagagggg	200	55	25	135/ 225 ^{a)}	Primer- BLAST
<i>IL-8</i>	cttggcagccttctgattt cagccctctcaaaaacttc	200	55	45	263	(XUE <i>et al.</i> 2002)
<i>SOCS2</i>	ctgcggtgccttgagccctc tgtctgaccgagctcccga	100	63	50	132	(MEINHARDT 2011)
<i>TNFRSF9</i>	ccgacctctctccgggagca gcaacgcagtcgacgtcagc	200	61	40	111	(MEINHARDT 2011)
<i>TNFRSF9</i>	ccgacctctctccgggagca gcaacgcagtcgacgtcagc	200	61	40	111	(MEINHARDT 2011)

c = eingesetzte Primerkonzentration, T = Annealingtemperatur, Z. = Zyklenzahl

L = erwartete Fragmentlänge, ^{a)} Fragmentlänge aus cDNA: 135 bp; aus DNA: 225 bp

Tabelle 18: Primerpaare für bovine Gene mit angewendeter Konzentration, Annealingtemperatur, Zyklenzahl und erwarteter Fragmentlänge

Gen	Primer fwd (5' → 3') Primer rev (5' → 3')	c [nM]	T [°C]	Z.	L [bp]	Quelle
<i>GAPDH</i>	aatttggctacagcaacaggg aactcttctctcgtgctcc	200	59	35	104	(LINDNER 2013)
<i>IL-8</i>	aaagtgggtgcagaagggtg ccacacagaacatgaggcac	200	59	35	173	(LINDNER 2013)
<i>TNFRSF9</i>	gtggctactgtgctattggt gtccactgtgctggagaaa	200	59	40	148	Primer- BLAST

c = eingesetzte Primerkonzentration, T = Annealingtemperatur, Z. = Zyklenzahl

L = erwartete Fragmentlänge

10.3 Zellkulturassays zur Antibiotikabehandlung replikativer und persistenter *C. psittaci*- Infektionen

Tabelle 19: Reduktion rekultivierbarer Chlamydien nach Antibiotikabehandlung replikativer *C. psittaci*- Infektion zum Zeitpunkt 12 h p.i.; Anteil an AB- unbehandelter Kontrolle (in %); 24- bzw. 96- stündige Inkubationsdauer; vor und nach Inkubation in AB- freiem Medium; grün: Abnahme der rekultivierbaren Chlamydien gegenüber der unbehandelten Kontrolle um > 99,9 %; zweiseitiger Student's T- Test: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; AB = Antibiotikum, Doxy = Doxycyclin, Ery = Erythromycin, Levo = Levofloxacin, Rif = Rifampicin

AB		24 h Inkubation				96 h Inkubation			
		vor AB- freiem M.		nach AB- freiem M.		vor AB- freiem M.		nach AB- freiem M.	
		AB	+ Rif	AB	+ Rif	AB	+ Rif	AB	+ Rif
MIC	Doxy	0,08***	0,02***	33,3***	18,5***	0,07***	0,04***	2,7***	3,6***
	Ery	19,6***	0,06***	65,2	28,0***	38,8***	0,03***	81,0	3,9***
	Levo	0,03***	0,02***	0,75***	17,8***	0,02***	0,02***	0,20***	0,26***
	Rif	1,2***	-	44,0***	-	0,42***	-	18,6***	-
10 MIC	Doxy	0,02***	0,01***	0,43***	0,16***	0,02***	0,02***	0,60***	0,03***
	Ery	0,02***	0,01***	44,4***	0,43***	0,02***	0,02***	5,6***	0,02***
	Levo	0,02***	0,01***	0,06***	0,25***	0,01***	0,01***	0,01***	0,02***
	Rif	0,02***	-	10,3***	-	0,01***	-	1,0***	-

Tabelle 20: Reduktion rekultivierbarer Chlamydien nach Antibiotikabehandlung replikativer *C. psittaci*- Infektion zum Zeitpunkt 48 h p.i.; Anteil an AB- unbehandelter Kontrolle (in %); 24- bzw. 96- stündige Inkubationsdauer; vor und nach Inkubation in AB- freiem Medium; grün: Abnahme der rekultivierbaren Chlamydien gegenüber der unbehandelten Kontrolle um > 90 %; Signifikanzen und Legende siehe Tabelle 19

AB		24 h Inkubation				96 h Inkubation			
		vor AB- freiem M.		nach AB- freiem M.		vor AB- freiem M.		nach AB- freiem M.	
		AB	+ Rif	AB	+ Rif	AB	+ Rif	AB	+ Rif
MIC	Doxy	21,1***	20,9***	49,9*	46,7*	8,7***	8,1***	673***	407***
	Ery	28,8***	18,6***	66,3	43,7**	42,6*	7,5***	555***	473***
	Levo	16,3***	16,2***	54,9*	38,5**	7,1***	6,7***	599***	512***
	Rif	22,6***	-	64,9	-	11,2***	-	448***	-
10 MIC	Doxy	23,9***	23,2***	6,2***	4,3***	9,1***	4,9***	5,4*	2,6*
	Ery	21,2***	22,4***	62,2	8,2***	5,0***	5,3***	351***	22,1*
	Levo	26,1***	23,8***	26,9***	5,1***	5,6***	5,9***	487**	72,4
	Rif	20,5***	-	12,3***	-	11,0***	-	44,4	-

Tabelle 21: Reduktion rekultivierbarer Chlamydien nach Antibiotikabehandlung persistenter *C. psittaci*- Infektion zum Zeitpunkt 12 h p.i.; Anteil an AB- unbehandelter Kontrolle (in %); 24- bzw. 96- stündige Inkubationsdauer; mit und ohne Reaktivierung; grün: Abnahme der rekultivierbaren Chlamydien gegenüber der unbehandelten Kontrolle **um > 99,9 %; Signifikanzen und Legende siehe Tabelle 19**

AB		24 h Inkubation				96 h Inkubation			
		ohne Reaktivier.		mit Reaktivier.		ohne Reaktivier.		mit Reaktivier.	
		AB	+ Rif	AB	+ Rif	AB	+ Rif	AB	+ Rif
MIC	Doxy	11,5***	0,21***	1,9***	0,87***	1,2***	1,1***	0,48***	2,0***
	Ery	23,5***	0,26***	16,0***	0,88***	16,8***	0,97***	115	8,1***
	Levo	0,16***	0,14***	0,26***	0,27***	0,78***	0,75***	0,09***	0,79***
	Rif	7,1***	-	8,3***	-	2,8***	-	13,5***	-
10 MIC	Doxy	0,08***	0,05***	0,28***	0,23***	0,63***	0,52***	0,09***	0,14***
	Ery	0,09***	0,08***	0,23***	0,21***	0,42***	0,31***	0,08***	0,14***
	Levo	0,07***	0,06***	0,14***	0,16***	0,31***	0,38***	0,04***	0,06***
	Rif	0,09***	-	1,01***	-	0,50***	-	1,4***	-

Tabelle 22: Reduktion rekultivierbarer Chlamydien nach Antibiotikabehandlung persistenter *C. psittaci*- Infektion zum Zeitpunkt 48 h p.i.; Anteil an AB- unbehandelter Kontrolle (in %); 24- bzw. 96- stündige Inkubationsdauer; mit und ohne Reaktivierung; grün: Abnahme der rekultivierbaren Chlamydien gegenüber der unbehandelten Kontrolle **um > 90 %; Signifikanzen und Legende siehe Tabelle 19**

AB		24 h Inkubation				96 h Inkubation			
		ohne Reaktivier.		mit Reaktivier.		ohne Reaktivier.		mit Reaktivier.	
		AB	+ Rif	AB	+ Rif	AB	+ Rif	AB	+ Rif
MIC	Doxy	11,1**	20,3*	35,6	164	67,6	66,7	56,5	63,7
	Ery	16,0*	11,8**	18,8*	28,1*	49,0*	107	252	163
	Levo	5,3**	5,4**	201	20,0*	67,0	88,1	92,1	97,8
	Rif	14,0*	-	44,8	-	150	-	57,7	-
10 MIC	Doxy	17,9*	42,1	15,0*	36,0	53,6*	109	11,5**	23,8**
	Ery	37,4	50,7	21,6*	54,8	66,7	126	79,5	101
	Levo	65,1	37,6	16,3*	30,2*	112	154	0,72***	0,73***
	Rif	47,7	-	54,8	-	73,1	-	26,1**	-

10.4 Chlamydiale Genexpression unter Antibiotikabehandlung

Tabelle 23: Expressionsänderung ausgewählter chlamydialer Gene unter Antibiotikabehandlung replikativer *C. psittaci*- Infektionen im Vergleich zur AB- unbehandelten Kontrolle; zu den Zeitpunkten 12 und 48 h p.i.; Inkubation 12 bzw. 24 h; rot: Hoch-, grün: Herunterregulation um den Faktor ≥ 2 gegenüber der AB- unbehandelten Kontrolle; weiß: keine Regulation; n = 3 bzw. 2 (Zugabe 12 bzw. 48 h p.i.)

AB	Gen	Zugabe 12 h p.i.				Zugabe 48 h p.i.			
		AB einzeln		+ Rifampicin		AB einzeln		+ Rifampicin	
		12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
Doxycyclin	<i>16S rRNA</i>	1,89 ± 0,22	3,55 ± 1,39	0,93 ± 0,17	0,88 ± 0,12	0,66 ± 0,27	0,92 ± 0,82	0,62 ± 0,25	0,55 ± 0,38
	<i>gyrA</i>	0,76 ± 0,22	3,76 ± 1,86	0,46 ± 0,19	1,69 ± 0,83	0,60 ± 0,13	1,71 ± 1,33	1,32 ± 0,68	1,49 ± 0,25
	<i>ompA</i>	2,74 ± 0,65	4,59 ± 0,47	0,05 ± 0,03	0,08 ± 0,03	0,93 ± 0,48	0,29 ± 0,17	0,30 ± 0,08	0,16 ± 0,06
	<i>ftsW</i>	1,99 ± 1,15	3,85 ± 1,69	0,92 ± 0,31	2,81 ± 1,99	0,63 ± 0,05	1,51 ± 1,13	1,39 ± 0,75	1,46 ± 0,05
	<i>amiB</i>	2,83 ± 0,45	8,71 ± 2,37	0,95 ± 0,17	1,91 ± 1,29	0,58 ± 0,01	1,73 ± 1,52	1,41 ± 0,73	1,37 ± 0,14
	<i>amn</i>	0,79 ± 0,27	1,92 ± 0,23	0,52 ± 0,07	1,29 ± 1,04	0,50 ± 0,06	1,04 ± 0,82	1,25 ± 0,61	1,32 ± 0,09
	<i>cpaf</i>	1,86 ± 0,26	3,76 ± 0,30	1,14 ± 0,19	1,78 ± 0,27	0,63 ± 0,03	1,17 ± 0,98	1,23 ± 0,64	1,19 ± 0,04
	<i>sctN</i>	0,72 ± 0,03	0,94 ± 0,41	0,48 ± 0,02	1,06 ± 0,37	0,54 ± 0,10	1,13 ± 0,87	1,02 ± 0,50	1,14 ± 0,27
	<i>Tsp</i>	0,19 ± 0,08	0,22 ± 0,08	0,14 ± 0,03	0,20 ± 0,06	0,59 ± 0,05	0,88 ± 0,63	1,19 ± 0,55	1,16 ± 0,16
	<i>groEL</i>	1,61 ± 0,17	2,08 ± 0,43	0,22 ± 0,10	0,49 ± 0,31	0,53 ± 0,15	1,04 ± 0,71	1,03 ± 0,39	1,04 ± 0,28
Erythromycin	<i>16S rRNA</i>	2,33 ± 0,35	3,11 ± 0,70	0,80 ± 0,10	1,35 ± 0,13	0,65 ± 0,19	0,84 ± 0,57	0,34 ± 0,07	0,33 ± 0,17
	<i>gyrA</i>	1,69 ± 0,12	3,67 ± 1,18	0,29 ± 0,13	1,52 ± 1,31	1,11 ± 0,45	0,91 ± 0,72	0,31 ± 0,16	1,22 ± 0,41
	<i>ompA</i>	3,70 ± 1,42	6,49 ± 0,66	0,17 ± 0,02	0,32 ± 0,13	0,91 ± 0,20	0,41 ± 0,09	0,11 ± 0,04	0,14 ± 0,07
	<i>ftsW</i>	1,44 ± 0,35	6,09 ± 4,44	0,69 ± 0,14	5,68 ± 4,89	1,19 ± 0,38	0,82 ± 0,70	0,36 ± 0,22	1,16 ± 0,35
	<i>amiB</i>	3,40 ± 0,37	10,3 ± 4,8	0,59 ± 0,16	4,51 ± 4,02	1,28 ± 0,41	0,68 ± 0,55	0,30 ± 0,17	1,19 ± 0,32
	<i>amn</i>	1,35 ± 0,37	4,74 ± 2,85	0,26 ± 0,08	3,65 ± 3,27	1,25 ± 0,32	0,73 ± 0,69	0,30 ± 0,17	1,17 ± 0,46
	<i>cpaf</i>	1,92 ± 0,51	2,74 ± 0,86	0,36 ± 0,09	1,51 ± 0,87	1,12 ± 0,25	0,77 ± 0,65	0,30 ± 0,17	1,01 ± 0,31
	<i>sctN</i>	0,48 ± 0,09	1,98 ± 1,13	0,38 ± 0,03	1,24 ± 0,85	1,06 ± 0,40	0,71 ± 0,61	0,22 ± 0,09	0,94 ± 0,47
	<i>Tsp</i>	0,17 ± 0,06	0,34 ± 0,18	0,10 ± 0,02	0,41 ± 0,25	1,09 ± 0,28	0,69 ± 0,63	0,33 ± 0,17	0,92 ± 0,31
	<i>groEL</i>	1,17 ± 0,18	2,08 ± 0,53	0,21 ± 0,09	0,58 ± 0,55	1,19 ± 0,49	0,71 ± 0,61	0,23 ± 0,10	0,91 ± 0,50
Levofloxacin	<i>16S rRNA</i>	5,50 ± 0,99	17,7 ± 7,2	1,21 ± 0,21	1,50 ± 0,18	0,53 ± 0,13	0,25 ± 0,06	0,40 ± 0,18	0,16 ± 0,09
	<i>gyrA</i>	0,86 ± 0,23	2,01 ± 1,47	0,41 ± 0,18	0,88 ± 0,56	2,25 ± 0,78	1,30 ± 0,77	1,92 ± 1,11	1,20 ± 0,27
	<i>ompA</i>	0,10 ± 0,02	0,29 ± 0,13	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,65 ± 0,06	0,15 ± 0,11	0,38 ± 0,15	0,10 ± 0,04
	<i>ftsW</i>	3,34 ± 1,13	13,7 ± 6,2	1,04 ± 0,37	3,46 ± 2,23	2,88 ± 1,41	1,40 ± 0,82	2,03 ± 1,22	1,20 ± 0,27
	<i>amiB</i>	2,34 ± 0,17	9,87 ± 6,13	0,98 ± 0,48	0,54 ± 0,28	2,60 ± 1,13	1,03 ± 0,53	2,07 ± 1,41	1,05 ± 0,05
	<i>amn</i>	1,39 ± 0,43	4,54 ± 1,60	0,72 ± 0,12	1,31 ± 0,17	2,36 ± 0,89	1,09 ± 0,59	2,07 ± 1,41	1,10 ± 0,17
	<i>cpaf</i>	3,82 ± 0,59	3,30 ± 1,20	0,46 ± 0,14	0,42 ± 0,19	2,26 ± 0,99	1,10 ± 0,70	1,57 ± 1,07	0,81 ± 0,15
	<i>sctN</i>	0,53 ± 0,18	1,63 ± 0,91	0,25 ± 0,09	0,14 ± 0,09	1,74 ± 0,55	0,95 ± 0,62	2,20 ± 1,54	0,77 ± 0,27
	<i>Tsp</i>	0,46 ± 0,17	1,17 ± 0,32	0,23 ± 0,02	0,21 ± 0,08	2,05 ± 0,78	0,91 ± 0,56	1,87 ± 1,16	0,83 ± 0,21
	<i>groEL</i>	4,33 ± 0,43	7,17 ± 0,93	0,52 ± 0,38	0,41 ± 0,25	2,15 ± 0,68	1,08 ± 0,72	1,61 ± 0,85	0,79 ± 0,32
Rifampicin	<i>16S rRNA</i>	0,65 ± 0,05	0,67 ± 0,05			0,71 ± 0,44	0,48 ± 0,28		
	<i>gyrA</i>	0,35 ± 0,18	1,73 ± 1,43			1,98 ± 1,27	2,57 ± 0,57		
	<i>ompA</i>	0,02 ± 0,01	0,19 ± 0,11			0,41 ± 0,16	0,24 ± 0,15		
	<i>ftsW</i>	0,49 ± 0,05	5,00 ± 3,81			2,12 ± 1,36	2,28 ± 0,86		
	<i>amiB</i>	0,63 ± 0,35	3,65 ± 3,11			2,17 ± 1,56	2,33 ± 0,81		
	<i>amn</i>	0,31 ± 0,01	1,45 ± 1,14			1,61 ± 1,03	2,34 ± 1,27		
	<i>cpaf</i>	0,40 ± 0,12	0,93 ± 0,54			1,91 ± 1,34	2,18 ± 0,95		
	<i>sctN</i>	0,24 ± 0,08	1,33 ± 0,62			1,61 ± 1,03	1,80 ± 0,93		
	<i>Tsp</i>	0,08 ± 0,02	0,32 ± 0,15			1,45 ± 0,69	1,62 ± 0,75		
	<i>groEL</i>	0,25 ± 0,06	1,59 ± 0,54			1,67 ± 0,97	1,80 ± 0,93		

Tabelle 24: Expressionsänderung ausgewählter chlamydialer Gene unter Antibiotikabehandlung persistenter *C. psittaci*- Infektionen im Vergleich zur AB- unbehandelten Kontrolle; zu den Zeitpunkten 12 und 48 h p.i.; Inkubation 12 bzw. 24 h; rot: Hoch-, grün: Herunterregulation um den Faktor ≥ 2 gegenüber der AB- unbehandelten Kontrolle; weiß: keine Regulation; n = 3 bzw. 2 (Zugabe 12 bzw. 48 h p.i.)

AB	Gen	Zugabe 12 h p.i.				Zugabe 48 h p.i.			
		AB einzeln		+ Rifampicin		AB einzeln		+ Rifampicin	
		12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
Doxycyclin	<i>16S rRNA</i>	1,07 ± 0,36	1,14 ± 0,55	0,42 ± 0,17	0,40 ± 0,21	1,87 ± 0,76	2,44 ± 0,70	0,75 ± 0,12	1,67 ± 0,88
	<i>gyrA</i>	0,83 ± 0,26	0,82 ± 0,18	0,65 ± 0,25	0,96 ± 0,32	1,28 ± 0,72	4,06 ± 1,03	0,92 ± 0,26	1,93 ± 0,90
	<i>ompA</i>	1,52 ± 0,50	2,49 ± 1,50	0,08 ± 0,03	0,11 ± 0,08	0,92 ± 0,23	2,61 ± 0,87	0,48 ± 0,25	0,61 ± 0,17
	<i>ftsW</i>	1,00 ± 0,43	1,07 ± 0,35	0,75 ± 0,15	1,80 ± 0,50	1,11 ± 0,35	5,53 ± 1,93	0,92 ± 0,60	3,14 ± 0,59
	<i>amiB</i>	1,58 ± 0,60	1,59 ± 0,56	0,59 ± 0,44	1,42 ± 0,62	3,14 ± 2,52	4,46 ± 3,00	2,69 ± 1,45	2,71 ± 1,29
	<i>amn</i>	1,10 ± 0,82	0,96 ± 0,26	0,31 ± 0,09	1,00 ± 0,52	1,05 ± 0,37	5,42 ± 2,87	0,99 ± 0,57	3,19 ± 0,55
	<i>cpaf</i>	2,07 ± 0,79	1,54 ± 0,91	1,55 ± 0,14	1,28 ± 0,45	2,04 ± 1,20	4,77 ± 2,70	1,08 ± 0,49	2,29 ± 1,71
	<i>sctN</i>	0,60 ± 0,08	1,16 ± 0,68	0,47 ± 0,27	1,37 ± 0,42	0,30 ± 0,25	7,23 ± 0,50	1,38 ± 0,19	4,71 ± 1,35
	<i>Tsp</i>	0,70 ± 0,29	1,18 ± 0,43	0,43 ± 0,19	1,04 ± 0,23	0,54	4,57 ± 0,71	1,41	5,11 ± 1,86
	<i>groEL</i>	1,24 ± 0,30	0,97 ± 0,24	0,55 ± 0,20	1,11 ± 0,35	1,73 ± 1,10	5,96 ± 3,23	1,39 ± 0,07	2,57 ± 2,02
Erythromycin	<i>16S rRNA</i>	1,14 ± 0,27	1,01 ± 0,41	0,66 ± 0,23	0,56 ± 0,29	2,03 ± 0,35	0,90 ± 0,38	0,99 ± 0,20	1,49 ± 0,81
	<i>gyrA</i>	1,54 ± 0,65	0,92 ± 0,65	1,32 ± 0,62	0,37 ± 0,17	2,10 ± 0,53	0,96 ± 0,41	1,12 ± 0,12	1,84 ± 1,09
	<i>ompA</i>	1,40 ± 0,42	2,61 ± 1,62	0,18 ± 0,03	0,22 ± 0,16	1,72 ± 0,35	0,95 ± 0,24	0,21 ± 0,09	0,41 ± 0,35
	<i>ftsW</i>	1,51 ± 0,36	1,35 ± 0,66	1,49 ± 0,41	0,81 ± 0,05	1,91 ± 0,91	1,11 ± 0,69	0,80 ± 0,72	3,33 ± 0,95
	<i>amiB</i>	1,70 ± 0,51	1,39 ± 0,68	0,84 ± 0,28	1,06 ± 0,28	9,60 ± 6,96	1,58 ± 0,71	1,79 ± 0,28	2,82 ± 1,78
	<i>amn</i>	1,41 ± 0,65	1,09 ± 0,18	1,07 ± 0,28	0,48 ± 0,07	1,89 ± 1,25	1,88 ± 0,26	1,04 ± 0,53	3,57 ± 1,19
	<i>cpaf</i>	2,57 ± 0,63	1,66 ± 1,10	1,17 ± 0,24	1,57 ± 0,73	3,19 ± 0,06	1,47 ± 0,60	1,72 ± 0,21	3,11 ± 1,65
	<i>sctN</i>	0,66 ± 0,43	1,66 ± 0,50	0,84 ± 0,19	1,32 ± 0,42	3,41 ± 1,03	1,79 ± 0,28	2,59 ± 1,27	3,21 ± 0,66
	<i>Tsp</i>	1,03 ± 0,55	0,78 ± 0,08	0,91 ± 0,41	0,59 ± 0,02	3,48	1,39 ± 0,24	1,62	3,33 ± 0,95
	<i>groEL</i>	0,91 ± 0,29	1,29 ± 0,55	0,45 ± 0,12	0,32 ± 0,05	1,97 ± 1,07	2,19 ± 0,19	1,35 ± 0,16	3,52 ± 1,95
Levofloxacin	<i>16S rRNA</i>	5,45 ± 4,74	5,30 ± 4,56	0,88 ± 0,63	1,70 ± 1,45	1,06 ± 0,22	1,47 ± 1,17	0,67 ± 0,14	1,34 ± 0,96
	<i>gyrA</i>	1,43 ± 0,71	1,37 ± 0,14	1,20 ± 0,49	4,76 ± 2,21	0,83 ± 0,17	1,87 ± 1,06	2,10 ± 0,83	2,20 ± 1,54
	<i>ompA</i>	0,11 ± 0,01	0,33 ± 0,13	0,20 ± 0,08	0,36 ± 0,25	0,36 ± 0,12	0,30 ± 0,22	0,17 ± 0,09	0,45 ± 0,36
	<i>ftsW</i>	5,93 ± 4,76	4,57 ± 3,00	2,38 ± 1,16	7,62 ± 4,29	1,13 ± 0,29	2,57 ± 2,02	1,04 ± 0,76	3,08 ± 1,85
	<i>amiB</i>	5,49 ± 3,32	3,90 ± 2,20	1,40 ± 0,71	11,1 ± 5,6	3,85 ± 2,43	2,56 ± 2,36	1,62 ± 0,00	3,48 ± 2,58
	<i>amn</i>	1,95 ± 1,18	3,88 ± 2,82	1,17 ± 0,27	5,84 ± 2,76	1,61 ± 0,19	2,55 ± 1,74	1,42 ± 0,10	3,16 ± 2,12
	<i>cpaf</i>	4,85 ± 3,45	1,40 ± 0,43	1,14 ± 0,21	9,55 ± 2,58	1,44 ± 0,07	2,19 ± 1,95	1,68 ± 0,06	2,42 ± 2,02
	<i>sctN</i>	1,10 ± 0,61	1,92 ± 1,18	0,65 ± 0,15	10,4 ± 5,6	0,95 ± 0,05	2,38 ± 1,76	1,47 ± 0,15	4,09 ± 0,35
	<i>Tsp</i>	1,25 ± 0,16	4,01 ± 3,20	0,66 ± 0,28	6,92 ± 2,98	1,07	2,76 ± 1,53	1,62	6,18 ± 0,32
	<i>groEL</i>	5,40 ± 4,26	2,26 ± 1,42	0,53 ± 0,04	3,55 ± 1,56	2,17 ± 0,76	3,50 ± 2,35	1,52 ± 0,11	3,29 ± 2,56
Rifampicin	<i>16S rRNA</i>	0,60 ± 0,14	0,37 ± 0,13			0,68 ± 0,11	1,30 ± 0,70		
	<i>gyrA</i>	1,58 ± 0,90	0,88 ± 0,05			1,50 ± 0,57	1,69 ± 0,12		
	<i>ompA</i>	0,18 ± 0,10	0,27 ± 0,13			0,19 ± 0,02	0,28 ± 0,14		
	<i>ftsW</i>	1,43 ± 0,51	1,43 ± 0,36			1,46 ± 0,35	2,25 ± 0,39		
	<i>amiB</i>	1,04 ± 0,12	1,68 ± 0,32			3,92 ± 3,05	2,02 ± 0,28		
	<i>amn</i>	0,97 ± 0,59	0,84 ± 0,16			1,70 ± 0,59	2,30 ± 0,00		
	<i>cpaf</i>	1,00 ± 0,14	1,05 ± 0,44			2,05 ± 0,98	1,83 ± 0,72		
	<i>sctN</i>	0,36 ± 0,05	1,39 ± 0,66			2,58 ± 1,71	2,70 ± 0,33		
	<i>Tsp</i>	1,25 ± 0,65	0,68 ± 0,21			0,76	2,35 ± 0,48		
	<i>groEL</i>	0,81 ± 0,30	0,72 ± 0,28			0,97 ± 0,03	2,06 ± 0,49		

10.5 Genexpression von *IL-8* und *TNFRSF9* in Lungengewebe von Kälbern

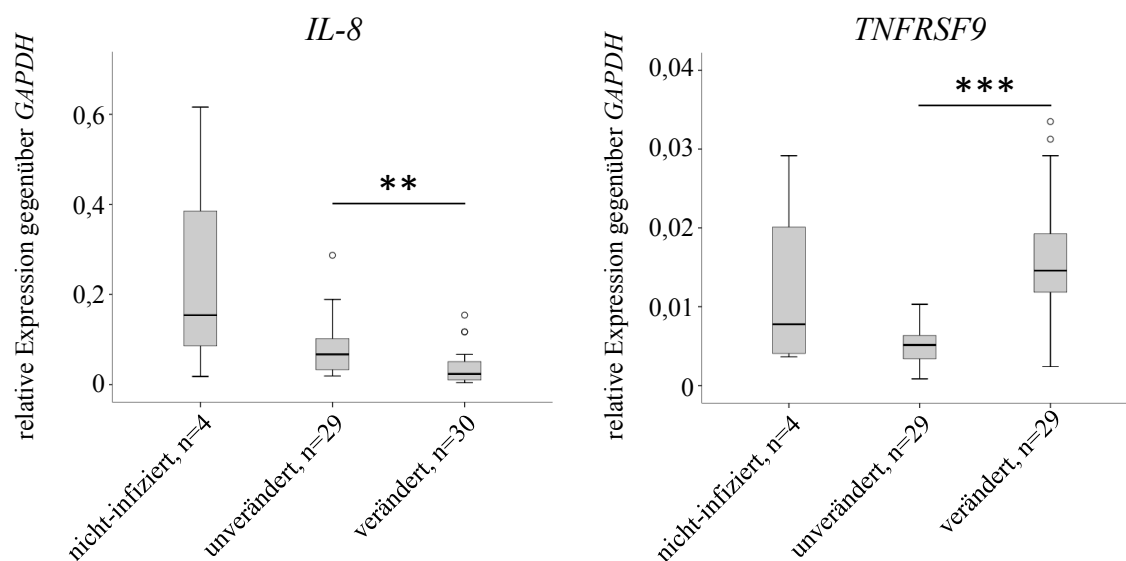


Abbildung 31: Expression von *IL-8* bzw. *TNFRSF9* in makroskopisch verändertem bzw. unverändertem Lungengewebe *C. psittaci*-infizierter Kälber sowie in Gewebe nicht-infizierter Tiere; Darstellung der relativen Expression des jeweiligen Gens in Relation zur *GAPDH* als Boxplot; Student's T-Test: ** p < 0,01, * p < 0,001; Darstellung modifiziert nach (PROHL *et al.* 2015c)**